

Aus dem
Institut für Veterinär-Pathologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Die Caco-2 Zellkultur, ein geeignetes In-vitro-System zum Studium anti-
gen-abhängiger Effekte auf Enterozyten?**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Michaela Möhring geb. Thomassen
aus Offenburg

Leipzig, 2003

Gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Graduierten-
kollegs „Schlachtetierbelastung und Produktsicherheit“ (III GK GRK 39/2-98)

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon

Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon
Institut für Veterinär-Pathologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Max Michael Wittenbrink
Institut für Veterinärbiologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich

Prof. Dr. Uwe Truyen
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Tag der Verteidigung: 02.02.2004

Meiner Familie

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Morphologie des Darmes unter besonderer Berücksichtigung ultrastruktureller Charakteristika des Enterozyten	2
2.1.1	Ultrastrukturelle Charakteristika der Haftkomplexe	4
2.2	Spezifische Transportmechanismen des Enterozyten	5
2.2.1	Charakterisierung des Stofftransportes	5
2.2.1.1	Pathophysiologie des Chlorid- und des Wassertransportes	6
2.2.2	Transportmechanismen von Makromolekülen	8
2.3	Ausgewählte Aspekte zum Einsatz sowie zu Vor- und Nachteilen der Gewebekultur	9
2.3.1	Die Geschichte und der Nutzen der Gewebekultur	9
2.3.2	Die Vorteile der Gewebekultur	10
2.3.3	Die Nachteile der Gewebekultur	10
2.4	Morphologisch-funktionelle Charakteristika ausgewählter Darmzelllinien	11
2.4.1	Humane Kolonkarzinomzelllinien	11
2.4.1.1	Die HT-29 Zelllinie	12
2.4.1.2	Die T84 Zelllinie	12
2.4.1.3	Die Caco-2 Zelllinie	12
2.5	Morphologische und funktionelle Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur im Vergleich zu den Enterozyten und zum Kolonkarzinom	13
2.5.1	Morphologie der Caco-2 Zellkultur im Vergleich zu den Enterozyten und zum Kolonkarzinom	13
2.5.2	Funktionelle Gegenüberstellung der Caco-2 Zellkultur und des Enterozyten	16
2.6	Die bakterielle Translokation an epithelialen Barrieren	17
2.6.1	Theorien zu Translokationsmechanismen von Antigenen <i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i>	18
2.6.1.1	Untersuchungen zu Translokationsmechanismen von Antigenen im Darmkanal	18
2.6.1.2	Untersuchungen zu Translokationsmechanismen von Antigenen an der Caco-2 Zellkultur	19
2.6.2	Bedeutung der bakteriellen intestinalen Translokation in der Humanmedizin	20
2.6.3	Zusammenhang zwischen der Belastung von Schlachttieren und der intestinalen bakteriellen Translokation	21
2.7	Allgemeine strukturelle Charakteristika und Wirkungen von Endotoxinen	22
2.7.1	Die biochemische Struktur der Endotoxine	23
2.7.2	Untersuchungen zur Wirkung der Endotoxine auf den Makroorganismus	24
2.7.3	Untersuchungen zur Wirkung von Endotoxinen auf den Darm und auf die Caco-2 Zellkultur	25
2.8	Rotaviren	26
2.8.1	Taxonomie, Morphologie und Replikation	26

2.8.2	Rotavirusinfektionen bei unterschiedlichen Spezies unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse beim Schwein	27
2.8.3	Die Wirkung von Rotaviren auf die Caco-2 Zelllinie	28
2.9	Salmonellen	28
2.9.1	Geschichte und Taxonomie der Salmonellen	28
2.9.2	Morphologie der Salmonellen	29
2.9.3	Pathogenitätsmechanismen der Salmonellen.....	30
2.9.4	Mechanismen der Interaktion von Salmonellen und Epithelzellen <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	33
2.10	Sekundärinfektionen	35
2.10.1	Bakterielle Sekundärinfektionen nach einer Virusinfektion bei unterschiedlichen Spezies unter besonderer Berücksichtigung des Darmtraktes	35
2.10.2	<i>In-vitro</i> -Beobachtungen bei Sekundärinfektionen an verschiedenen Zelllinien	35
3.	MATERIAL UND METHODEN	37
3.1	Caco-2 Zellkultur/Infektion.....	37
3.1.1	Die Caco-2 Zellkultur	37
3.1.2	Salmonella typhimurium-LPS	39
3.1.3	LPS-Versuche I-IV	39
3.1.4	Infektionsversuche	40
3.2	Immunhistologische und transmissionselektronenmikroskopische Präparation. 44	
3.2.1	Präparation für die Immunhistologie und die TUNEL-Technik.....	44
3.2.2	Präparation und Auswertung der Semidünnschnitte.....	45
3.2.3	Transmissionselektronenmikroskopische Präparation und Auswertung	46
3.2.4	Berechnung der Mittelwerte und Mittelwertabweichungen	47
4.	ERGEBNISSE	48
4.1	Morphologische Charakterisierung der Caco-2 Zellkultur	48
4.2	Morphologie der Kontroll-Zellkulturen.....	48
4.2.1	Morphologische Befunde an Semidünnschnitten	48
4.2.2	Morphologische Befunde an Ultradünnschnitten	49
4.3	Morphologie der mit LPS behandelten Zellkultur.....	56
4.4	Immunhistologische Befunde und Nachweis von Apoptose	56
4.4.1	Nachweis von Ki-67 Antigen und von PCNA.....	56
4.4.2	Nachweis von Apoptosen mittels TUNEL-Technik und Transmissionselektronenmikroskopie	57
4.5	Morphologie der Caco-2 Zellkultur im Anschluss an eine Infektion	57
4.5.1	Morphologische Befunde an Semidünnschnitten	57
4.5.2	Infektion der Caco-2 Zellkultur mit Rotaviren.....	59
4.5.2.1	Morphologische Befunde an Ultradünnschnitten	59
4.5.2.2	Immunhistologische Befunde	63

4.5.3	Infektion der Caco-2 Zellkultur mit Salmonellen.....	63
4.5.3.1	Morphologische Befunde an Ultradünnschnitten	63
4.5.3.2	Immunhistologische Befunde	68
4.5.4	Sekundärinfektion.....	68
4.5.5	Sekundärinfektion im Vergleich zur Monoinfektion hinsichtlich der Anzahl der infizierten Zellen und der Erreger pro Zelle	73
4.5.6	Morphologischer Vergleich der infizierten Zellen mit den nicht infizierten Zellen innerhalb einer infizierten Caco-2 Zellkultur	79
5.	DISKUSSION.....	80
5.1	Ziel der Arbeit.....	80
5.2	Charakterisierung der verwendeten Caco-2 Zellkultur	80
5.3	Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Inkubation mit LPS im Vergleich zu Enterozyten <i>in-vivo</i>	83
5.4	Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Infektion mit Rotaviren im Vergleich zu Enterozyten <i>in-vivo</i>	85
5.5	Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Infektion mit Salmonellen im Vergleich zu Enterozyten <i>in-vivo</i>	88
5.6	Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Infektion mit Rotaviren und mit Salmonellen im Vergleich zu Enterozyten <i>in-vivo</i>	92
5.7	Abschließende Betrachtung.....	95
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
7.	SUMMARY	98
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
9.	ANHANG	121
9.1	Subkultivierung der Caco-2 Zellkultur	121
9.2	Zellzahlbestimmung	121
9.3	Herstellung der Rotavirussuspension	122
9.4	Herstellung der Salmonellensuspension.....	122
9.5	Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchung.....	122
9.5.1	Vorbehandlung	122
9.5.2	Besondere Verfahren	123

9.5.3	Antigennachweis mittels monoklonaler Antikörper nach der PAP-Methode	123
9.5.4	Antigennachweis mittels polyklonaler Antikörper nach der PAP-Methode	124
9.5.5	Standard zur Nachbehandlung	124
9.6	Verwendete Antikörper und Seren für die Immunhistologie	125
9.7	Durchführung der TUNEL-Technik	126
9.8	Verwendete Lösungen und Puffer für die Immunhistologie und die TUNEL Technik	127
9.9	Vergleichende Übersicht der Monoinfektion und der Sekundärinfektion in der Caco-2 Zellkultur	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFU	colony-forming-units
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chloridionen
CO ₂	Kohlendioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DFD	dark firm dry
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia coli
ER	endoplasmatisches Retikulum
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
evtl.	eventuell
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Fall- oder Schwerebeschleunigung
gER	glattes endoplasmatisches Retikulum
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)

H^+	Wasserstoffionen
HCO_3^-	Bikarbonationen
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin
hl	hitzelabil
hs	hitzestabil
IL	Interleukin
incl.	inclusive
K^+	Kaliumionen
Kap.	Kapitel
KBE	Kolonien bildende Einheit
KID	Kulturinfektionsdosis
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
m^2	Quadratmeter
Na^+	Natriumionen
nm	Nanometer
O_2	Sauerstoff
OH^-	Hydroxidionen
P.	Passage(n)
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase Methode
PBS	Phosphate-buffered-saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
p.i.	post infectionem
PSE	pale soft exudative
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	ribonucleic acid: Ribonukleinsäure
s.	siehe
S.	Seite
SA	Standardabweichung

sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
sog.	so genannte
sp.	Spezies
spp.	Subspezies
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered-saline
TCID	tissue culture infective dose
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
u.	und
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleichend
VP	Virusprotein
Y.	Yersinia
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μm	Mikrometer

1. Einleitung

Mit Hilfe der Versuche des Graduiertenkollegs „Schlachttierbelastung und Produktsicherheit“ der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig soll mittels experimenteller Untersuchungen der Einfluss einer chronischen oralen Endotoxinbelastung (LPS von *Salmonella typhimurium*) auf Schlachtschweine ermittelt und die Fragestellung bearbeitet werden, ob bakterielle und virale Infektionen von Schlachtschweinen unter Belastungssituationen Auswirkungen auf die Produktqualität besitzen und möglicherweise ein Risiko für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen.

Neben *in-vivo* Versuchen zur Beurteilung komplexer pathophysiologischer Reaktionen an der „Funktionseinheit Magen-Darm-Trakt“ sollen auch *in-vitro* Systeme zum Studium einzelner Strukturelemente etabliert, evaluiert und eingesetzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, mit Hilfe von *in-vitro* Versuchen den Einfluss enteropathogener Erreger sowie deren Toxine auf die Morphologie des Enterozyten –als wesentlichster Bestandteil der intestinalen Barriere– zu untersuchen, um festzustellen, inwieweit eine direkte Zellschädigung lediglich durch zytotoxische Effekte auftritt und/oder mediatorvermittelte Vorgänge ätiopathogenetisch eine Rolle spielen.

Zu diesem Zweck wird die Caco-2 Zelllinie als *in-vitro* Enterozytenmodell genutzt, um mögliche Parallelen zu morphologischen Veränderungen am Darm von Schlachtschweinen aufzuzeigen, denen endotoxinbelastetes (LPS von *Salmonella typhimurium*) Futter verabreicht wurde.

Von besonderem Interesse ist es, die morphologischen Effekte von:

- *Salmonella typhimurium*-LPS (in verschiedenen Konzentrationen und nach unterschiedlichen Expositionszeiten)
- Rotaviren (als Monoinfektion bei variierenden Expositionszeiten)
- *Salmonella typhimurium* (als Monoinfektion bei variierenden Expositionszeiten)
- Rotaviren (als Primärinfektion) und *Salmonella typhimurium* (als Sekundärinfektion)

auf die Caco-2 Zellkultur darzustellen und mit Hilfe der konventionellen Histopathologie, der Immunhistochemie und der Transmissionselektronenmikroskopie detailliert zu charakterisieren. Die Resultate sollen anschließend mit den Befunden am Darm *in-vivo* belasteter Schweine verglichen werden.

Die apikale Zellmembran der Enterozyten zeichnet sich durch einen 1 µm breiten, dichten Mikrovillibesatz (Abb. 2.2) aus (TIDBALL 1971, BRITTAN u. WRIGHT 2002). Die Anzahl der Mikrovilli liegt bei 2000-3000 je Zelle bzw. 50-100 Millionen pro m² Epitheloberfläche (GEBBERS u. LAISSUE 1984, SMOLLICH u. MICHEL 1992). Der Mikrovillisaum dient sowohl der Oberflächenvergrößerung, als auch der Abwehr luminaler Toxine, Bakterien, Protozoen und Viren. Er ist bedeckt von einer aus Glykoproteinen und Glykolipiden bestehenden Glykokalix (ITO 1965, EGBERTS et al. 1984). Durch ihren Gehalt an sekretorischem Immunglobulin A (sIgA) stellt die Glykokalix einen effektiven Schutz gegen große Partikel und Bakterien dar (ITO 1965).

Die Mikrovilli werden von 30-40 Zentralfilamenten durchzogen, die parallel zur Achse angeordnet sind und aus Myosin, Aktin und Tropomyosin bestehen (GEBBERS u. LAISSUE 1984). Diese Filamente strahlen in den apikalen Zytoplasmabereich ein (HULL u. STAEHELIN 1979, MOTTA u. FUJITA 1988, SMOLLICH u. MICHEL 1992) und bilden mit den parallel zur Zelloberfläche verlaufenden Filamenten das Terminalgespinst („*terminal web*“). Durch die Ausstattung mit Zentralfilamenten sind die Mikrovilli aktiv bewegungsfähig (PADYKULA 1977, GEBBERS u. LAISSUE 1984).

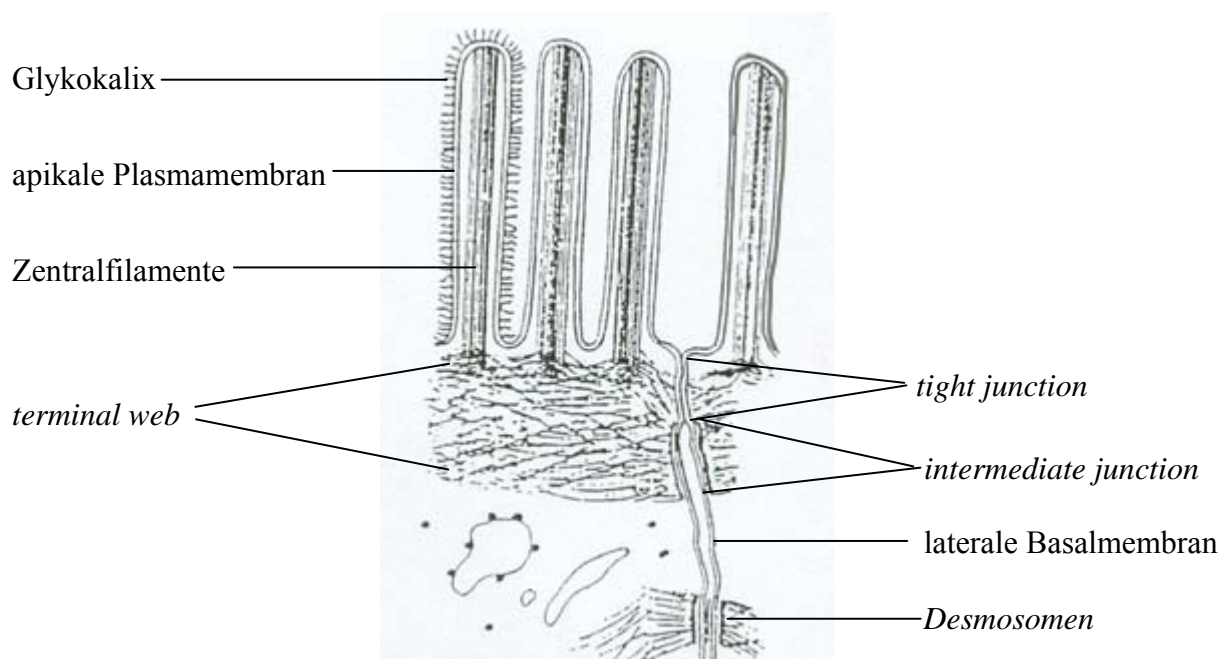


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Mikrovillisaums von Enterozyten (modifiziert nach TRIER 1968)

Weiterhin besitzen die Enterozyten ein stabilisierendes Zytoskelett. Es besteht aus den röhrenförmigen, gestreckt verlaufenden *Mikrotubuli*, den zarten *Mikrofilamenten*, die das filzartig verwobene Flechtwerk („*terminal web*“) bilden und den *Intermediärfilamenten*, die beispielsweise in die *Halbdesmosomen* bzw. *Desmosomen* einstrahlen und diese festigen. Neben der Stützfunktion ist das Zytoskelett auch für die Zelldynamik (z.B. für die Bewegung der Zellorganellen) von Bedeutung (KOPF-MAIER u. MERKER 1989).

Die Position des Zellkerns innerhalb der Zelle ist abhängig vom Alter des Tieres und von der Darmregion. Bei neugeborenen Ferkeln sind die Kerne vor allem apikal, im Duodenum auch in der Mitte der Zellen gelegen, während sie bei älteren Tieren eine basale Position einnehmen (CLARKE u. HARDY 1971). Supranukleär liegen das aus Tubuli, Vesikeln und Zisternen bestehende Golgi-Feld, mehrere Mitochondrien vom Crista-Typ (MATSUDA et al. 1989), wenige Lysosomen sowie einige Lamellen des rauen und glatten endoplasmatischen Retikulums (rER, gER). Im infranukleären Raum sind ebenfalls Mitochondrien und Anteile von rER erkennbar (DAVID u. UERLINGS 1967, MATSUDA et al. 1989). Innerhalb der amorphen Zytoplasmamatrix befinden sich viele freie Ribosomen und eine variable Anzahl feiner Filamente. Benachbarte Zellen sind apikal durch spezifische Zellkontakte und basal durch Interdigitationen miteinander verbunden. An der Zellbasis sind Erweiterungen der Interzellularräume (Abb. 2.1, S. 2) zu beobachten, die vor allem zwischen den Zellen der Zottenpitze (des Darmes) besonders auffällig sind (TRIER u. MADARA 1981, MOON et al. 1983, MOTTA u. FUJITA 1988).

2.1.1 Ultrastrukturelle Charakteristika der Haftkomplexe

In epithelialen Geweben von Vertebraten (außer im Plexus choroideus und im Pigmentepithel der Retina) sind benachbarte Epithelzellen basal durch Interdigitationen (zytoplasmatische Ausstülpungen) und apikal durch einen Bereich spezialisierter Kontaktstellen miteinander verbunden (REVEL 1982, KIRKPATRICK u. PFEIFER 1995).

Unter dem Begriff *Haftkomplex* (lichtmikroskopisch als „Schlussleistennetz“ bezeichnet) werden drei morphologisch unterschiedliche Zonen zusammengefasst (Abb. 2.2, S. 3):

- *Tight junction* (Syn.: Zonula occludens)
- *Intermediate junction* (Syn.: Zonula adhaerens)
- *Desmosom* (Syn.: Macula adhaerens).

Die apikal, d.h. an der Basis der Mikrovilli gelegene *tight junction* verläuft als kontinuierlicher, aus parallel zueinander angeordneten Proteinreihen bestehender Verschlusskontakt um die gesamte Zelle (MADARA 1988, ANDERSON et al. 1993, FURUSE 1998). Die Ausdehnung der *tight junction* von apikal nach basal hat eine Länge von 100-700 nm (DOBBINS 1975, SCHNEEBERGER u. LYNCH 1992). Perijunktional ist stets eine Verdichtung im Zytoplasma erkennbar. Basal der *tight junction* befindet sich die *intermediate junction*, ein ca. 300-500 nm langer Bereich mit homogenem, amorphem Material geringer Dichte im ca. 25 bis 35 nm breiten Interzellularspalt. Die dritte Zone des Haftkomplexes, das *Desmosom* (besteht aus zwei *Halbdesmosomen*), zeichnet sich durch eine ca. 200 bis 300 nm lange streifenförmige Verdichtung des ca. 24 nm breiten extrazellulären Spaltes aus (FARQUAHR u. PALADE 1963, STAEHELIN 1974). Parallel zur inneren Zellmembran verlaufen zytoplasmatische Plaques, in die Intermediärfilamente aus Zytokeratinen einstrahlen (GUMBINER 1987).

Gap junctions sind nicht zum Haftkomplex zählende, spezielle Strukturen an der basolateralen Zellmembran der Enterozyten. Es handelt sich dabei um eine Annäherung benachbarter Zellmembranen (bis auf ca. 3 nm), die in diesem Bereich mit Ionenkanälen ausgestattet sind. Über diese erfolgt eine metabolische Zellkommunikation und die Übertragung elektrischer Signale (SCHNEEBERGER u. LYNCH 1992).

2.2 Spezifische Transportmechanismen des Enterozyten

2.2.1 Charakterisierung des Stofftransportes

Die Enterozyten sind in der Lage, die Passage von Ionen, Lösungen und Wasser zu regulieren und zwar über einen trans- und einen parazellulären Weg (COLEGIO et al. 2002). Die wichtigste Aufgabe des Dickdarmes ist die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Hierbei werden vor allem Natrium (Na^+) und Chlorid (Cl^-) absorbiert, und Kalium (K^+) und Bikarbonat (HCO_3^-) sezerniert (RECHKEMMER 1992). Passiv folgt das Wasser parazellulär (PACHA 2000) und transzellulär dem, durch die transzelluläre Absorption von Elektrolyten entstehenden, osmotischen Gradienten (PACHA 2000). Der Organismus hat im Dickdarm die letzte Möglichkeit, noch einmal auf die Zusammensetzung der Fäzes einzuwirken. Neben Neurotransmittern besitzen auch eine Vielzahl parakriner Substanzen, die bei immunologischen Prozessen, wie z.B. Antigen-Antikörper-Reaktionen, oder bei Entzündungen freigesetzt werden, einen Einfluss auf den Ionentransport (BREVES u. DIENER 2000).

Die nichtselektive Membranpermeabilität ermöglicht es vor allem **Nichtelektrolyten**, wie **Wasser**, O_2 und CO_2 sowie **kleinen polaren** (z.B. Ethanol und Harnstoff) und **lipophilen Substanzen** (z.B. Steroidhormone), mittels **Diffusion** (passiv) durch die Zellmembran zu gelangen. Dieser Vorgang ist nicht sättigbar (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

Für geladene **Ionen** wie Na^+ , K^+ , Cl^- und für **hydrophile Substanzen** wie Glukose und Aminosäuren stellt die Zellmembran eine fast impermeable Membran dar. Der Austausch zwischen Extra- und Intrazellularraum wird daher durch membranständige Transportproteine (**Carrier**) und/oder relativ selektive **Kanäle** ermöglicht (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

Der Stofftransport durch geöffnete **Kanäle** erfolgt, wie bei der Diffusion, in Richtung der treibenden Kraft, ist passiv und nicht sättigbar. Soweit es sich um geladene Teilchen (z.B. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) handelt, muss neben dem chemischen auch der elektrische Gradient berücksichtigt werden. Diese beiden Gradienten können entweder einzeln oder gemeinsam als elektrochemischer Gradient auf den Ionenfluss einwirken (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

Die **Carrier** transportieren „ihre“ Substanzen entweder nur in eine Richtung (Uniport) oder im Austausch gegen einen anderen Stoff über die Zellmembran (Antiport/Exchanger) und zwar „bergab“ (passiv) bzw. „bergauf“ (aktiv). Werden von einem Carrier gleichzeitig zwei (z.B. Na^+ /Glukose-Symport im Duodenum) oder gar drei Substanzen (z.B. Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ Symport im distalen Tubulus) in dieselbe Richtung verschoben, so nennt man es Symport oder Cotransport. Im Gegensatz zum Transport durch Kanäle ist der carrier-vermittelte Transport sättigbar (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

Die **erleichterte Diffusion** ermöglicht einen passiven, spezifischen Transport (z.B. Glukose), der sättigbar ist. Dieser Vorgang wird durch Uniporter, Symporter und auch Antiporter ermöglicht (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

2.2.1.1 Pathophysiologie des Chlorid- und des Wassertransportes

Chlorid wird vorwiegend im Dickdarm resorbiert (Abb. 2.3, S. 7). Vermittelt wird die transzelluläre Cl^- -Resorption durch sekundäre aktive Cl^-/HCO_3^- Austauscher in der apikalen Zellmembran (ARGENZIO u. ARMSTRONG 1993, RAJENDRAN u. BINDER 1999). Die Kopplung dieser Transporter geschieht dabei über den pH-Wert der Zelle, in dessen Regulation auch ein apikaler Cl^-/OH^- Austauscher involviert ist (RAJENDRAN u. BINDER 1999). Die Mechanismen, über die Cl^- -Ionen die Zelle basolateral verlassen, sind bisher unzureichend geklärt (BREVES u. DIENER 2000).

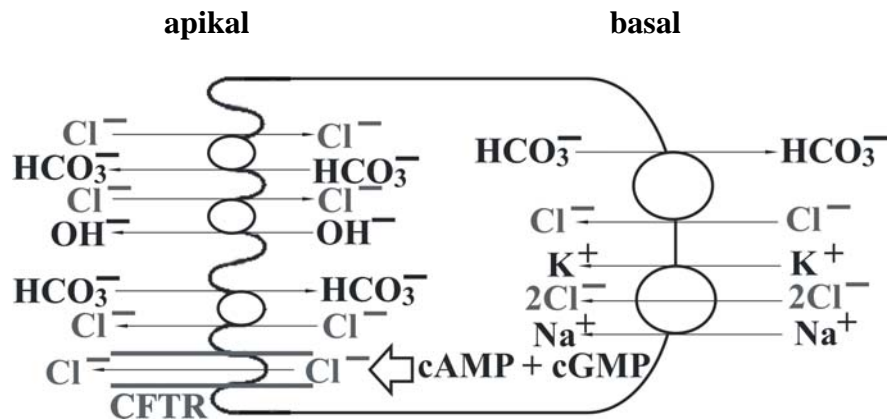


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Chloridtransportes am Enterozyten (modifiziert nach VIDYASAGAR u. RAMAKRISHNA 2002)

Für die aktive intestinale Cl⁻-Sekretion wird Cl⁻ basolateral über den Na⁺/K⁺/2Cl⁻ Kotransporter aufgenommen (DELCASTILLO u. SEPULVEDA 1995, PACHA 2000, KUNZELMANN u. MALL 2002). Als Antriebskraft für diesen sekundär aktiven Transporter dient der Na⁺-Gradient, der durch die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase aufrechterhalten wird und das K⁺-Diffusionspotential (PACHA 2000). Eine weitere Möglichkeit der Zelle, basolateral Cl⁻ aufzunehmen ist ein von SUZUKI et al. (1994) nachgewiesener Cl⁻/HCO₃⁻ Austauscher in der basolateralen Membran. Basolateral aufgenommene Cl⁻-Ionen werden über apikale Cl⁻-Kanäle in das Darmlumen ausgeschleust (PACHA 2000).

Die Cl⁻-Sekretion wird in den Epithelzellen vor allem durch drei intrazelluläre Second-messenger-Systeme reguliert: cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) und der Kalzium (Ca²⁺)-Signalweg.

Das cAMP und das cGMP fördert die Cl⁻-Sekretion direkt, indem es das Öffnen von Cl⁻-Kanälen in der Bürstensaummembran auslöst.

Der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration induziert eine erhöhte Permeabilität der *tight junctions* (SAWAI et al. 2002) und weiterhin eine Öffnung der basolateralen K⁺-Kanäle. Durch die Öffnung der basolateralen K⁺-Kanäle wird das Membranpotential an das Gleichgewichtspotential von K⁺ angenähert und die Zellmembran hyperpolarisiert. Die Antriebskraft für den Austritt der negativ geladenen Cl⁻-Teilchen aus der Zelle steigt an, die Cl⁻-Sekretion wird also indirekt stimuliert. Das Wasser folgt passiv den sezernierten Elektrolyten aus osmotischen Gründen (BREVES u. DIENER 2000, KUNZELMANN u. MALL 2002). Bei unphysiologisch starker Aktivierung dieser Sekretion, kann das sezernierte Volumen um ein Vielfa-

ches ansteigen, klinisch resultiert daraus eine Diarrhoe (SEIBERT et al. 1999, BREVES u. DIENER 2000).

Eine fehlgeleitete Aktivierung der Cl^- -Sekretion kann z.B. erfolgen, wenn es durch bakterielle Toxine (z.B. von *Yersinia enterocolitica* (Abb. 2.4) oder das hitzestabile Toxin von *E. coli*) zu einer Stimulation der Guanylatcyclase und damit zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration kommt (BREVES u. DIENER 2000). Das Cholera toxin und die hitzelablen Toxine von *E. coli* bewirken den Anstieg des intrazellulären cAMP über die Aktivierung der Adenylatcyclase. Beides (cGMP- und cAMP-Anstieg) bewirkt eine Öffnung des luminalen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), der einen Cl^- Kanal in der apikalen Membran in den Enterozyten darstellt und die transepitheliale Cl^- -Sekretion reguliert, was letztendlich zu einem vermehrten Cl^- Ausstrom (KUNZELMANN u. MALL 2002) und somit klinisch zu einer Diarrhoe führt (SEIBERT et al. 1999, BREVES u. DIENER 2000).

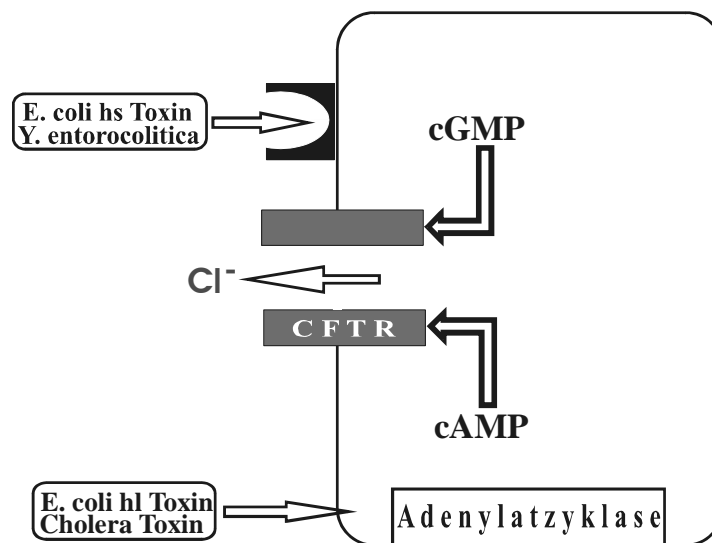


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Chloridausstromes über den CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) am Enterozyten, ausgelöst durch *Y. enterocolitica*, durch *E. coli* hitzestabiles (hs) oder hitzelabiles (hl) Toxin sowie durch das Cholera Toxin (modifiziert nach KUNZELMANN u. MALL 2002)

2.2.2 Transportmechanismen von Makromolekülen

Neben den bereits beschriebenen Transportvorgängen des Enterozyten (vgl. Kap. 2.2.1, S. 5) stehen der Zelle weitere Mechanismen zur Stoffaufnahme und -abgabe von Makromolekülen (z.B. Immunglobuline, Bakterien, Viren, Endotoxine) zur Verfügung (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

Bei der **Endozytose** werden feste (Phagozytose) oder gelöste Stoffe (Pinozytose) durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran ins Zytosol aufgenommen. Gegenüber der Phagozytose ist die Pinozytose nicht sehr spezifisch (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

Neben Alter und Tierart spielt die Funktionsfähigkeit des Immunsystems der Darmschleimhaut bei der Aufnahme von Makromolekülen eine wichtige Rolle. Bei Neugeborenen treten für eine unterschiedlich lange Zeit nach der Geburt durch die Muttermilch aufgenommene Makromoleküle (z.B. Immunglobuline) durch die Enterozyten der Dünndarmwand (GOLDSTEIN et al. 1979, KAUP 1993, SHEN u. XU 2000). Die Aufnahmefähigkeit der Makromoleküle durch den Enterozyten ist abhängig von der epithelialen Reifung und der mit dem Alter ansteigenden intraluminalen Proteolyse (MARTIN et al. 1993, 1997). Aufgrund der rezeptorvermittelten Endozytose kommt es beim Neugeborenen nicht zu einem Abbau der Immunglobuline, so dass diese intakt in das Blut aufgenommen werden (WALKER u. ISSELBACHER 1974). Nach dem Schluss der Darmschranke besitzen Enterozyten nur noch eine eingeschränkte Kapazität für die Aufnahme und den Transport von Makromolekülen (WALKER u. ISSELBACHER 1977).

Dennoch kommt es auch bei gesunden älteren Individuen, vor allem im Bereich des follikel-assoziierten Epithels, zu einer Aufnahme größerer Moleküle, wie beispielsweise bakteriellen Fragmenten, Endotoxinen und Antigenen durch energieabhängige Mechanismen (VIVES et al. 2003). Hierbei werden keine Krankheitsprozesse ausgelöst (WALKER u. ISSELBACHER 1974), es können aber lokale und/oder systemische Immunreaktionen hervorgerufen werden (GEBBERS u. LAISSUE 1982). Insbesondere bei Stresssituationen kann es vor allem im Jejunum zu einer vermehrten transepithelialen makromolekularen Aufnahme kommen (KILIAAN et al. 1998).

Umgekehrt kommt es bei der **Exozytose** zur Verschmelzung intrazellulär vorgebildeter und Makromoleküle enthaltender Vesikel mit der Zellmembran und damit zu einer Freisetzung des Vesikelinhaltes in das Außenmedium (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

2.3 Ausgewählte Aspekte zum Einsatz sowie zu Vor- und Nachteilen der Gewebekultur

2.3.1 Die Geschichte und der Nutzen der Gewebekultur

Die Gewebekultur wurde zu Beginn des 20ten Jahrhunderts (HARRISON 1907, CARREL 1912) als eine Methode entwickelt, die es erlaubt, das Verhalten von Zellen unabhängig von

systemischen Variationen zu studieren. Der Ausdruck „Gewebekultur“ umfasst sowohl die Organkultur als auch die Zellkultur. Mit der „Organkultur“ wird eine Kultur eines unzerlegten Gewebes bezeichnet, in der die histologischen Charakteristika des ursprünglichen Gewebes erhalten bleiben. Der Ausdruck „Zellkultur“ bezieht sich auf Kulturen, die von vereinzelter Zellen des Originalgewebes, von einer Primärkultur, einer Zelllinie oder einem Zellstamm durch enzymatische, mechanische oder chemische Dissoziation gewonnen werden (FRESHNEY 2000).

Einsatz findet die Gewebekultur besonders bei der Untersuchung der intrazellulären Aktivität und des intrazellulären Stofftransportes bei Ernährungs- und Infektionsversuchen, bei Überprüfung von Arzneimittelwirkungen und Reaktionen der Zelle auf externe Reize. Darüber hinaus eignen sich Gewebekulturen für Zell zu Zell-Wechselwirkungsstudien (FRESHNEY 2000) und spielen in der Implantationsmedizin eine wichtige Rolle (NEREM 2003).

2.3.2 Die Vorteile der Gewebekultur

Der Hauptvorteil einer Gewebekultur besteht in der Kontrollierbarkeit des physikalisch-chemischen Milieus (pH-Wert, Temperatur, osmotischer Druck, O₂- und CO₂-Tension), welches einerseits sehr genau überwacht und andererseits relativ konstant gehalten werden kann (OLMSTED 1967, HONN et al. 1975).

In Gewebekulturen besteht die Möglichkeit, unter Umgehung der allgemeinen Stoffwechselsituation des Gesamtorganismus, den direkten Einfluss eines spezifischen Reagens auf die Zelle zu untersuchen, mit dem die Kultur beimpft wurde (FRESHNEY 2000). Hieraus resultiert ein geringerer Substanzbedarf im Vergleich zu Injektionen *in-vivo*, bei denen > 90% des Reagens durch Exkretion und Verteilung im Gewebe verloren gehen. Einerseits umgehen *in-vitro* Untersuchungen die rechtlichen, moralischen und ethischen Probleme des Tierversuches und andererseits gestalten sich experimentelle Studien an Gewebekulturen mit Nutzung spezifischer ausgewählter Variablen (z.B. Milieu, verschiedene Konzentrationen und Expositionszeiten) und mit dem Einsatz vieler Kontrollkulturen wesentlich übersichtlicher und preisgünstiger als dies bei Tierversuchen gegeben ist (FRESHNEY 2000).

2.3.3 Die Nachteile der Gewebekultur

Die Zellen wachsen viel langsamer als die Mehrzahl der kontaminierenden Mikroorganismen, daher müssen die Kulturmethode unter streng aseptischen Bedingungen durchgeführt werden, um ein „Überwuchern“ der Kultur zu vermeiden (FRESHNEY 2000).

Ein weiterer Nachteil ist der Aufwand für die Herstellung von Langzeitzellkulturen sowie deren Instabilität im Gegensatz zu der Verwendung von Tieren. Kurzzeitkulturen sind zwar genetisch stabiler als Langzeitkulturen, weisen jedoch eine Heterogenität der Zellpopulation (unterschiedliche Wachstumsraten) auf, woraus bei der Passagierung unerwünschte Veränderungen in der Zellzusammensetzung resultieren (FRESHNEY 2000).

2.4 Morphologisch-funktionelle Charakteristika ausgewählter Darmzelllinien

Es gibt viele verschiedene Darmzelllinien, die für Untersuchungen grundlegender Fragestellungen hinsichtlich der Organisation und der Funktion intestinaler Zellen herangezogen werden. Für derartige Studien werden vorwiegend Kolonkarzinomzelllinien genutzt. Entgegen den histopathologischen Charakteristika eines Kolonkarzinoms *in-vivo* weisen die *in-vitro* eingesetzten humanen Kolonkarzinomzelllinien überwiegend die typischen morphologischen Merkmale von reifen Enterozyten auf (ZWEIBAUM et al. 1991). Erfolgreich etablierte Zelllinien vom unveränderten Darm der Ratte (z.B. IEC, IRD-98, RIE-1) zeigen dagegen *in-vitro* keine typischen Merkmale hinsichtlich einer Zelldifferenzierung übereinstimmend mit Enterozyten (CHOPRA et al. 1981, YEH et al. 1980).

Bei den meisten, von unterschiedlichen Säugetieren (Ratten, Mäuse, Meerschweinchen) stammenden Darmzelllinien, die mit chemischen Kanzerogenen behandelt worden sind (MARTIN et al. 1975, BRATTAIN et al. 1980, O'DONNELL u. COCKERELL 1981), existieren keine Angaben zu deren histomorphologischem und ultrastrukturellem Erscheinungsbild. Eingesetzt werden diese Zelllinien in unterschiedlichen Versuchen mit Hormon- und Nährstoffbehandlungen sowie zur physikalischen Untersuchung der Mukusdifferenzierung (ZWEIBAUM et al. 1991).

2.4.1 Humane Kolonkarzinomzelllinien

Die erste humane Kolonkarzinomzelllinie ist die HT-29 (FOGH u. TREMPER 1975).

Es gibt viele Zelllinien aus dem humanen Kolonkarzinom, wobei die meisten von ihnen als *in-vitro* Modell für Kolonkarzinomstudien genutzt werden. Da die biochemischen *in-vitro* Arbeiten sich den *in-vivo* Studien annähern, gibt es aus Sicht der Literatur keinen Anlass die Morphologie der genutzten Zelllinien zu beurteilen. Einige von den humanen Kolonkarzinomzelllinien (Caco-2, HT-29, T84) sind in der Lage, unter bestimmten Kultur- oder Behandlungsbedingungen, Differenzierungsmerkmale, entweder von reifen Enterozyten oder von Becherzellen sowie funktionelle Eigenschaften auszubilden, die für „Transportierendes Epi-

thel“ spezifisch sind (ZWEIBAUM et al. 1991).

2.4.1.1 Die HT-29 Zelllinie

Die HT-29 ist eine pluripotente intestinale Zelllinie von einem Kolonadenokarzinom und zeigt morphologisch als „Multilayer“ undifferenzierte, unpolare Zellen, die auch funktionell keine Charakteristika von intestinalen Zellen aufweisen (ZWEIBAUM et al. 1985). Verändert man die Kulturbedingungen und verabreicht der HT-29 glukosefreies Medium zeigt sich aber eine für Enterozyten typische Differenzierung (ZWEIBAUM 1986). Weiterhin isolieren LOUVARD et al. (1984) von der HT-29 verschiedene Klone (HT29-18), die unterschiedliche Zelltypen (90% Enterozyten-ähnliche Zellen und 10% Muzingranula-enhaltene Zellen), ähnlich der intestinalen Mukosa, ausbilden.

2.4.1.2 Die T84 Zelllinie

Die T84 ist eine funktionell gut differenzierte Zelllinie, die für hormonelle Studien und für Untersuchungen hinsichtlich der Zellproliferation verwendet wird (MURAKAMI u. MASUI 1980). Die Zelllinie wächst als „Monolayer“ aus polarisierten Zellen, die Cl^- sezernieren (DHARMSATHAPHORN et al. 1984) und Transporteigenschaften aufweisen (MCROBERTS et al. 1985, MANDEL et al. 1986). Obwohl die Zellen polarisiert sind, bilden sie aber keine Bürstensaummembran aus (MANDARA u. DHARMSATHAPHORN 1985).

2.4.1.3 Die Caco-2 Zelllinie

Die Caco-2 Zelllinie ist eine gut differenzierte Zelllinie, die einem humanen Kolonadenokarzinom entstammt (ROUSSET et al. 1980). Erst ca. 10 Jahre nach Etablierung dieser Zelllinie wird ihre Enterozyten-ähnliche Morphologie (typische Enterozytendifferenzierung, polarisierter „Monolayer“ mit der Ausbildung von *tight junctions*, apikale Ausbildung einer typischen Bürstensaummembran mit Mikrovillibesatz) beobachtet (ROUSSET et al. 1985). Die Caco-2 Zelllinie stellt somit ein sehr gutes Modell zur Untersuchung der intestinalen Epithelzellproliferation und der Zelldifferenzierung dar (UC u. BRITIGAN 2003). Funktionell (vom Wachstum abhängige Enzymaktivität) entspricht die Caco-2 Zelllinie ebenfalls den Enterozyten (ZWEIBAUM et al. 1986).

Es gibt noch weitere Zelllinien, die teilweise eine Enterozyten-ähnliche Zelldifferenzierung zeigen, aber sie besitzen entweder keine Bürstensaummembran, exprimieren keine spezifische Hydrolase (ein Zeichen der Enterozytendifferenzierung) oder sie bilden keine *tight junctions* aus, weswegen diese Zelllinien als Modellsystem für Translokationsvorgänge ungeeignet sind

(ZWEIBAUM et al. 1991).

2.5 Morphologische und funktionelle Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur im Vergleich zu den Enterozyten und zum Kolonkarzinom

2.5.1 Morphologie der Caco-2 Zellkultur im Vergleich zu den Enterozyten und zum Kolonkarzinom

Die Caco-2 Zellkultur stellt eine permanente Zelllinie dar, die von einem mäßig differenzierten humanen Kolonkarzinom stammt (CHANTRET et al. 1988).

Eine Besonderheit der Caco-2 Zellkultur besteht darin, dass während der Kultivierung Differenzierungsvorgänge zu beobachten sind, sie stellt damit ein sehr gutes Modell für Studien über die intestinale Zellproliferation und –differenzierung dar (PAGEOT et al. 2000). Die Zellkultur bildet einen dem Schleimhautepithel ähnlichen geschlossenen Monolayer und weist typische Charakteristika der humanen Darmmukosa auf (DELIE u. RUBAS 1997, GAUTHIER et al. 2001). Die Zellen sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein, einer apikalen, mit Mikrovilli ausgestatteten Oberfläche, *tight junctions*, *Desmosomen* (bestehend aus zwei *Halbdesmosomen*) (ANDERSON u. VANITALY 1995) und einer basalen und einer lateralen Zellmembran, so dass sich ein polarisierter Epithelzellverband entwickelt (RODRIGUEZ-BOULAN u. NELSON 1989). ANDERSON und VANITALY (1995) beschreiben aber dennoch eine gewisse, von den Inhaltstoffen des Mediums abhängige Heterogenität der Caco-2 Zellen.

Der Mikrovillisaum bedeckt in der frühen Phase der Proliferation (fünfter Tag) ca. 70% der Zellen und in der stationären Phase (neunter Tag) dann die gesamte Fläche der Caco-2 Zellkultur. Die Mikrovilli können als unterschiedliche Wachstumsformen auftreten, 50% bilden einen dicken Teppich und 50% erscheinen als „blumenstraußähnliche“ Büschel (PINTO et al. 1983).

In der Zeit vom siebten bis zum 21. Tag ähneln die Zellen der Caco-2 Zellkultur, durch ihr überwiegend hochprismatisches Erscheinungsbild, morphologisch den normalen Enterozyten (Tab. 2.1, S. 14). Intrazytoplasmatische Einschlüsse und Organellen sind asymmetrisch verteilt und der Interzellularspalt stellt sich besser dar, im Gegensatz zu den ein bis sieben Tage alten Zellen (BRISKE-ANDERSON et al. 1997).

BRISKE-ANDERSON et al. (1997) beschreiben aber auch, dass die Caco-2 Zellkultur innerhalb von neun bis 15 Tagen und besonders deutlich am 21. Tag „multizelluläre Erhabenhei-

ten“ (zwei- bis 20reihig) ausbildet, die drei bis 18% der Oberfläche der Zellkultur ausmachen. Diese, durch proliferatives Wachstum entstandenen „bumps“, werden häufig durch Kanäle penetriert, die von einem charakteristischen Bürstensaum ausgekleidet sind.

Tab. 2.1: Altersbedingte Veränderungen der Zellmorphologie und der Mikrovilli in der Caco-2 Zellkultur (18. Passage) (modifiziert nach HIDALGO 1989)

Alter der Zellen	Zellhöhe μm	Zellbreite μm	Länge der Mikro- villi, μm
3. Tag	$6,05 \pm 2,4$	$11,05 \pm 3,2$	$\sim 0,25$
6. Tag	$13,8 \pm 1,9$	$9,9 \pm 4,0$	$0,72 \pm 0,3$
16. Tag	$29,6 \pm 3,4$	$6,4 \pm 3,9$	$1,19 \pm 0,16$

Die Entwicklung und die Morphologie der Caco-2 Zellkultur werden durch das Alter der Zellkultur und die Anzahl der Passagen (optimal: 28 bis 65) (RILEY et al. 1991, BRISKE-ANDERSON et al. 1997) ebenso beeinflusst wie durch den pH-Wert des Mediums. Abweichungen, unabhängig davon, ob sie in den azidotischen oder basischen Bereich führen, stören die Homöostase der Caco-2 Zellkultur. Die Zellproliferation ist am höchsten bei dem pH-Wert 7,2 und die Enzymaktivität der Mikrovilli ist am markantesten bei einem pH-Wert von 8,5 (PERDIKIS et al. 1998).

Unabhängig von äußeren Einflüssen beginnen sich 25 bis 30 Tage alte Zellen der Caco-2 Zellkultur vom Rand der Kulturflaschen abzulösen und es kommt zum „Verfall“ (PINTO et al. 1983). Genauere Angaben über den Zelluntergang geben die Autoren nicht.

Im Vergleich dazu ist bei den Enterozyten des unveränderten Darmes bekannt, dass für die Balance der Zellerneuerung und die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase der genetisch kontrollierte, programmierte Zelltod (Apoptose) von Bedeutung ist (KERR et al. 1994). Die Enterozyten wandern während ihrer Reifung (Abb. 2.5, S. 15) vom Kryptengrund zur Darmsuperficie (TRABER 1994, BRITTAN u. WRIGHT 2002). An der Zottenspitze werden die Zellen im Bereich der Extrusionszone wieder abgestoßen (MOON et al. 1983, GORDON u. HERMISTON 1994, TRABER 1994). Diese Migrationszeit hängt von der Spezies, dem Alter und der Darmlokalisation ab. Sie dauert z.B. im Dünndarm neugeborener Ferkel sieben bis zehn Tage, bei drei Wochen alten Tieren dagegen nur zwei bis vier Tage (MOON et al. 1983). Im Dickdarm beträgt die Migrationszeit bei den landwirtschaftlichen Nutztieren ein bis zwei

Tage, bei Nagetieren zwei bis drei Tage (MESSIER u. LEBLOND 1960, CHANG u. LEBLOND 1971) und beim Menschen drei bis acht Tage (LIPKIN et al. 1963, MOTTA u. FUJITA 1988, BARBER et al. 1993).

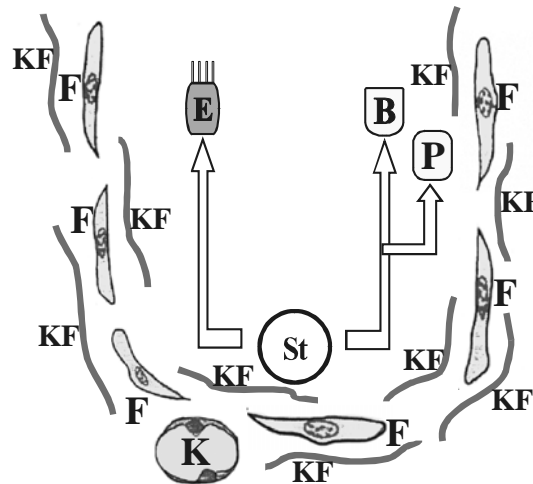


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Zellreifung in den Krypten von der Stammzelle (ST) bis zum Enterozyten (E), zur Becherzelle (B) oder zur Paneth Zelle (P); (F) Fibroblasten; (KF) Kollagenfasern; (K) Kapillare (modifiziert nach BRITTAN u. WRIGHT 2002)

Ein Kolonkarzinom entsteht unter anderem dadurch, dass das Gleichgewicht zwischen dem Zellwachstum und dem programmierten Zelltod (Apoptose) zugunsten einer unkontrollierten Proliferation gestört ist (BUTLER et al. 1999). Diese Proliferation ist mittels Ki-67 Antigen und/oder PCNA bei Menschen und Mäusen nachgewiesen worden (AKEDO et al. 2001, ALLEGRA et al. 2002).

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie erkennt DAVID (1967), dass die Tumorzellen des Kolonkarzinoms in den meisten Fällen eine angedeutete drüsige Struktur ausbilden, ultrastrukturell fast keine Polarität aufweisen (MATSUDA et al. 1989), aber unterschiedlich lange Mikrovilli ausbilden, die zum Teil nur aus Rudimenten bestehen (DAVID 1967).

Die Interzellularräume zwischen den Kolonkarzinomzellen sind dilatiert mit regional gehäuft auftretenden *Desmosomen* sowie durch Ausstülpungen der lateralen Zellmembran gekennzeichnet (DAVID 1967). Atypische Interdigitationen, sowie eine Abnahme der Anzahl der *Desmosomen*, im Vergleich zum normalen Darmepithel (Tab. 2.2, S. 16), beobachten dagegen MATSUDA et al. (1989) bei ihren Untersuchungen an Kolonkarzinomen.

Die Basalmembran des Kolonkarzinoms ist ultrastrukturell oft fragmentiert oder fehlt streckenweise, dadurch dringen vielfach Zellausläufer in die weitere Umgebung ein (DAVID 1967).

Die Zellen des Kolonkarzinoms zeigen ultrastrukturell pleomorphe Zellkerne und häufig Mitosen (MATSUDA et al. 1989). Im Zytoplasma der Tumorzellen sind einzelne Vesikel, Vakuolen oder kleine Schleimtropfen angesammelt (DAVID 1967, NOLTENIUS 1987). Die Mitochondrien sind vielfach geschwollen, die Cristae vermindert und gelegentlich sind auch degenerierte Mitochondrien im Zytoplasma zu beobachten. Das raue endoplasmatische Retikulum liegt in vesikulärer Form vor und die Anzahl der freien Ribosomen und Lysosomen ist meist hoch. Die Zellkerne sind sehr groß und häufig eingekerbt (DAVID 1967, MATSUDA et al. 1989).

Bei der quantitativen Analyse der ultrastrukturellen Charakteristika des Zellkerns und der Zellorganellen fällt eine Verschiebung des Kern-Plasmaverhältnisses zu Gunsten des Zellkerns und eine Zunahme der Lysosomen im Gegensatz zum normalen Darmepithel auf. Im Unterschied dazu zeigen sich bei der Anzahl der Mitochondrien keine deutlichen Abweichungen (Tab. 2.2) (MATSUDA et al. 1989).

Tab. 2.2: Quantitative Analyse ultrastruktureller Charakteristika eines „normalen Darmepithels“ im Vergleich zu Dickdarmkarzinomen (modifiziert nach MATSUDA et al. 1989).

	„normales Darmepithel“ n = 100	Kolonkarzinom n = 140
Kern-Plasmaverhältnis %	21,8 ± 8,3	41,1 ± 7,5
Lysosomen/Zelle	1,2 ± 1,2	8,8 ± 8,1
Mitochondrien/Zelle	35,7 ± 9,3	33,3 ± 14,8
Desmosomen/Zelle	31,3 ± 7,8	9,6 ± 4,9

2.5.2 Funktionelle Gegenüberstellung der Caco-2 Zellkultur und des Enterozyten

Einige Autoren (PINTO et al. 1983, HIDALGO et al. 1989, GAUTHIER et al. 2001) vergleichen die Caco-2 Zellkultur mit den Enterozyten des Dünndarms adulter Individuen, einige aber auch mit den Enterozyten eines fetalen Kolons (GRAND et al. 1976, HAURI et al. 1985), in dem die Mikrovilli vorübergehend die für dieses Gewebe typische Hydrolase syn-

thetisieren. Enzyme wie die Aminopeptidase und die alkalische Phosphatase, die typischerweise von Dünndarmenterozyten gebildet werden, sind ebenfalls in der Caco-2 Zellkultur anzutreffen. Kolonzellen bilden im Unterschied dazu diese Enzyme kaum (PINTO et al. 1983). Die Caco-2 Zellen exprimieren, wie auch das intestinale Epithel *in-vivo*, die Heme Oxygenase-1 (HO-1), die eine wichtige Rolle im Reifungsprozess der Zellen spielt (UC u. BRITIGAN 2003).

Die Zellkultur scheint als *in-vitro* Modell für Transportvorgänge am intestinalen Epithel geeignet, weil sowohl bezüglich der Permeabilität von Antibiotika (BIGANZOLI et al. 1999) als auch der Permeabilität von Enzymen (wie z.B. die Meerrettich-Peroxidase) eine große Ähnlichkeit zwischen dem Dünndarm und der Caco-2 Zellkultur beobachtet werden kann (HIDALGO et al. 1989). Der Na-abhängige Hexose-Transport in der Caco-2 Zellkultur entspricht ebenfalls dem des intestinalen Epithels, vorausgesetzt, sie wächst auf einem permeablen Träger (RILEY et al. 1991).

Vergleicht man den als Produkt des Widerstandes (Ω) x der Oberfläche (cm^2) definierten, transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) der Caco-2 Zelllinie mit dem intestinalen Gewebe, fällt auf, dass der TEER zwar variiert, aber generell sechs bis acht mal höher liegt, als im humanen Kolon (RUBAS 1996, DELI u. RUBAS 1997). Der transepitheliale elektrische Widerstand ist ein guter Marker für die Entwicklung der *tight junctions* und beschreibt somit die Monolayerintegrität. Die Elektrophysiologie gibt einen Einblick in die Lebensfähigkeit der Zellen und da der Transport von Peptiden, Zucker und Aminosäuren (TURNER et al. 1996) mit den H^+ , Cl^- oder Na^+ -Transporter gekoppelt ist (TSUJI u. TAMAI 1996), auch wichtige Informationen über die Aufnahme dieser Moleküle.

2.6 Die bakterielle Translokation an epithelialen Barrieren

Die intestinale Translokation von Bakterien ist definiert als die Passage der gastrointestinalen Mikroflora durch die Lamina propria in die Mesenteriallymphknoten und von hier aus weiter in den Organismus (YAO et al. 1995, MACFIE et al. 1999). In den Mesenteriallymphknoten kommt es zum Kontakt mit den Makrophagen und somit zur Stimulation von Zytokinen (YAO et al. 1995).

Das Darmepithel bildet daher eine Schutzbarriere, die eine Ausbreitung intraluminaler Erreger in das Gewebe und die Organe verhindern soll (DEITCH 1990, FINK et al. 1991). Sie besteht aus folgenden protektiven funktionellen Einheiten (ECKNAUER 1982, EGBERTS et al. 1985, FINK 1991):

Luminale Anteile:	Galle sowie Sekrete des Magens und des Pankreas, Mikroflora
Supraepithelialer Anteil:	Mukusschicht
Epithelschicht:	Epithelzellen und Interzellularkontakte
Immunsystem der Darmschleimhaut:	Intraepitheliale und einzelne in der Lamina propria vorkommende Lymphozyten, solitäre und aggregierte Lymphfollikel, sekretorische Immunglobuline.

Der Darm wird als wichtigstes immunologisches Kontaktorgan eines Individuums zur Außenwelt angesehen, da er aufgrund seiner großen Oberfläche der höchsten Antigen-Belastung ausgesetzt ist (RUCHTI et al. 1980, GEBBERS u. LAISSUE 1984). SCHULZ (1983) und TAY et al. (1989) zeigen, dass Salmonellen bei gesund erscheinenden Schlachtschweinen in die Organe der Tiere penetrieren können und somit eine Kontaminationsquelle für das Fleisch und eine Infektionsquelle für die Konsumenten darstellen.

2.6.1 Theorien zu Translokationsmechanismen von Antigenen *in-vivo* und *in-vitro*

2.6.1.1 Untersuchungen zu Translokationsmechanismen von Antigenen im Darmkanal

Verschiedene Autoren untersuchen die Interaktion zwischen pathogenen Bakterien und Enterozyten (FINLEY 1994, MEYERHOLZ u. STABEL 2003). Dabei spielen vor allem die Oberflächenstrukturen der Bakterien für die Aufnahme und das intrazelluläre Überleben der Erreger eine Rolle (BEACHEY 1981, ZHOU et al. 2001).

Hinsichtlich des Translokationsmechanismus von Mikroorganismen bestehen unterschiedliche Theorien. STALEY et al. (1969) und ALEXANDER et al. (1990) stellen fest, dass in Vakuolen gelegene Keime in den Enterozyten nicht verdaut werden können und durch die Epithelzelle in die darunter liegenden Strukturen eindringen. Es wird angenommen, dass Makrophagen die intestinalen Bakterien aufnehmen, dann aber die intrazelluläre Abtötung versagt und die Bakterien auf der extraintestinalen Seite, in den Mesenteriallymphknoten, wieder „freigelassen“ werden (WELLS et al. 1988). OWEN et al. (1982) beobachten in ihren Untersuchungen mit *Vibrio cholerae* und anderen, nicht identifizierten Darmbakterien eine Penetration durch die *tight junctions* zwischen Follikel-assoziierte Epithelzellen.

CRUZ et al. (1994a, b) und MEYERHOLZ et al. (2002) unterscheiden drei wesentliche Schritte der Translokation:

1. Assoziation der Bakterien mit der Mukusschicht
2. Penetration der Mukusschicht und Überwindung der Lamina epithelialis mittels:
 - a. passivem oder aktivem Eindringen in die Enterozyten
 - b. parazellulärer Passage
 - c. Eindringen durch die Abschlüpfungszone an der Zottenspitze
3. Streuung der Bakterien in die mesenterialen Lymphknoten, über die Portalvene in die inneren Organe oder Abtötung der Keime in den Phagozyten.

In untersuchten „loops“ (exenterierte Darmabschnitte) vom Schweineileum sind nach 10 Minuten Inkubation mit Salmonellen einzelne, in Vakuolen liegende Bakterien in M-Zellen, Enterozyten und in Becherzellen erkennbar (MEYERHOLZ u. STABEL 2003).

MADDAUS et al. (1986, 1988) bemerken bei ihren Translokationsversuchen in Mäusen, dass die T-Lymphozyten durch ihre Interleukin-2-Bildung die Translokation von *E. coli* hemmen.

2.6.1.2 Untersuchungen zu Translokationsmechanismen von Antigenen an der Caco-2 Zellkultur

Um die Interaktion von Bakterien und Enterozyten während bakterieller Translokationsvorgänge näher zu bestimmen, verwenden DARFEUILLE-MICHAUD et al. (1990) sowie FINLAY und FALKOW (1990) die Caco-2 Zellkultur. Die Autoren vertreten die Auffassung, dass diese Zellkultur geeignet ist, den Prozess der bakteriellen Translokation zu beobachten, da sie viele Eigenschaften des Dünndarmepithels (vermuteter Translokationsort) besitzt (obwohl sie von Zellen des Kolons abstammen) und zudem einfach zu handhaben ist.

Der von den Becherzellen sezernierte Schleim, der *in-vivo* als Schutz der Epithelzellen vor einer bakteriellen Aufnahme dient, ist bei der Caco-2 Zelllinie sehr gering (NIV et al. 1992). Auch MATTAR et al. (2002) beobachten eine Muzinproduktion, die bei den Caco-2 Zellen im Anschluss an eine dreistündige Inkubation mit *Lactobacillus casei* GG ansteigt und weiterhin eine dosisabhängige Hemmung der Translokation (hervorgerufen durch *Lactobacillus casei* GG) von *E. coli* durch die Caco-2 Zellen. Es ist daher anzunehmen, dass adhärente Bakterien die Muzinsekretion der Epithelzellen fördern und somit die bakterielle Translokation in die Caco-2 Zellen hemmen (MATTAR et al. 2002).

WELLS et al. (1993, 1994) inkubieren die Caco-2 Zellkultur mit unterschiedlichen Bakterien (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* und *E. coli*) für eine Stunde. Einzelne Keime finden sich an Enterozyten haftend, von Mikrovilli umschlossen oder

intrazellulär in membrangebundenen Vakuolen (WELLS et al. 1993, 1994, CLARK et al. 2003). Interzellulär, d.h. im Interzellulärspalt liegend, ist nur *Proteus mirabilis* nachweisbar. Eine erhöhte Aufnahme von Bakterien nach Inkubation mit einer ansteigenden Endotoxindosis von *E. coli* wird ebenso wenig beobachtet (WELLS et al. 1993), wie ein Einfluss durch die Anwesenheit anderer Bakterien.

CRUZ et al. (1994c) stellen bei ihren Translokationsversuchen mit *E. coli* (10^2 , 10^5 , 10^7 , 10^9 Bakterien/ml) und der Caco-2 Zellkultur im Anschluss an eine unterschiedlich lange Inkubation (20, 40, 120, 180 Minuten) einen zeit- und dosisabhängigen Prozess fest, indem sie die Anzahl der Bakterien im Medium, welches sich unterhalb der Caco-2 Zellkultur befindet, auswerten. Im Weiteren vermuten die Autoren einen teilweise rezeptorvermittelten Transport, da die Keime nur intrazellulär sichtbar sind. Eine morphologische Veränderung der *tight junctions* wird nicht festgestellt.

CLARK et al. (2003) beobachten bei ihren Translokationsversuchen mit *E. coli* und der Caco-2 Zellkultur eine verstärkte bakterielle Translokation bei einem verminderten ATP-Gehalt in den Zellen. Auch PANIGRAHI et al. (1997) entdecken bei einem verlängerten Glutaminentzug, der eine Reduktion der Na^+/K^+ -ATPase Aktivität induziert, eine ansteigende Transzytose von Bakterien in der Caco-2 Zellkultur. OELSCHLAEGGER (1993) beobachtet an unterschiedlichen Zelllinien eine Interaktion von *Campylobacter* und *Citrobacter* mit der Epithelzelloberfläche; eine Mikrotubuli-abhängige Membraninvagination, zur bakteriellen Aufnahme, wird auslöst. Entlang der Tubuli werden die Bakterien durch die Zelle geschleust.

Die bakterielle DNA (*E. coli*) wird von dem TLR-9 (Toll-like receptor-9), der u.a. auch von Caco-2, HT-29 und T84 exprimiert wird, erkannt und es kommt in den Enterozyten zu einer wachsenden IL-8 Produktion und somit zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (AKHTAR et al. 2003).

2.6.2 Bedeutung der bakteriellen intestinalen Translokation in der Humanmedizin

Der Darmtrakt bildet eine Barriere zwischen dem Individuum und seiner Umwelt, trotzdem kommen bakterielle Translokationen, besonders bei Neonaten (GORK et al. 1999) und bei stark belasteten Patienten z.B. auf Intensivstationen, vor. Somit stellt der Darmtrakt einen Ausgangspunkt von Bakteriämien dar (VANLEEUVEN et al. 1994, SWANK u. DEITCH 1996). Viele Ergebnisse aus Tierversuchen unterstützen die Theorie, dass die Translokation von Bakterien aus dem Darmtrakt in den Organismus durch eine Störung des Gleichgewichtes

der Darmflora, parenterale Ernährung, Trauma, Antibiotikagabe, Darmmotilitätsstörungen und verschiedene andere Stressoren gefördert wird (VANLEEUVEN et al. 1994, SWANK u. DEITCH 1996, OBOLYLE et al. 1998).

Nach DEITCH und BERG (1987), CRUZ et al. (1994a) sowie LLOVET et al. (1996) werden die Schutzmechanismen der Darmschranke hauptsächlich durch drei Faktoren beeinträchtigt und dadurch die bakterielle Translokation begünstigt:

1. Störung des Gleichgewichts der individuellen intestinalen Mikroflora
2. Zerstörung der Epithelschicht
3. Schwächung des Immunsystems.

OBOYLE et al. (1998) weisen in ihren Studien sowohl bei gesunden als auch bei postoperativ untersuchten Probanden Bakterien in den Mesenteriallymphknoten nach, wobei Patienten, die postoperativ Bakterien in den Lymphknoten enthalten, eine Sepsis ausbilden, im Gegensatz zu den gesunden. So scheint die Funktion des Immunsystems die bedeutendste Rolle zu spielen.

Bei den Bakterien, die in humanmedizinischen Studien, aber auch in Tierexperimenten in inneren Organen immer wieder nachgewiesen werden, handelt es sich v.a. um gram-negative, fakultativ anaerobe Enterobacteriaceen (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.), *Pseudomonas aeruginosa*, in geringer Anzahl auch gram-positive, sauerstofftolerante Keime (*Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus brevis*) (SAGAR et al. 1995). Obligate Anaerobier (z.B. *Bacteroides* spp.), die am häufigsten im Darmtrakt zu finden sind, werden nur sehr selten aus den inneren Organen isoliert. In den meisten Untersuchungen wird eine Kombination aus bakteriologischen und morphologischen Untersuchungstechniken angewendet. Die DNA-Sequenzierung mittels Polymerase-Kettenreaktion gewinnt auf diesem Gebiet immer mehr an Bedeutung (KANE et al. 1996).

2.6.3 Zusammenhang zwischen der Belastung von Schlachttieren und der intestinalen bakteriellen Translokation

Kommen Schlachttiere aus ihrer vertrauten Umwelt heraus, so wirken vor allem physische, psychische und klimatische Stressoren beim Verladen, während des Transports sowie am Schlachthof auf die Tiere ein (GRIFFITH 1989). Besonders Schweine sind aufgrund ihrer schwachen Kreislaufkonstitution anfällig für Belastungen (STEINHARDT u. LYHS 1974).

FERNANDEZ et al. (1991) und WARRIS (1994) weisen einen Zusammenhang zwischen

einer prämortalen Belastung und den erst nach der Schlachtung erkennbaren Mängeln in der Fleischqualität (PSE-, DFD-Fleisch) nach. Ob diese Belastungen zu einer intra vitam auftretenden primären bzw. endogenen mikrobiellen Kontamination (bakterielle Translokation) innerer Organe führen, ist bisher nur von wenigen Autoren untersucht worden (FEHLHABER et al. 1989, 1992, SCHÜPPEL et al. 1994, 1996, EHINGER 1998). Tiere mit klinischer Symptomatik oder sichtbaren pathologisch-anatomischen Veränderungen können im Anschluss an weiterführende Untersuchungen, z.B. der bakteriologischen Fleischuntersuchung, für tauglich bzw. untauglich erklärt werden. Latent infizierte oder stark belastete Tiere ohne klinische Symptomatik oder pathologisch-anatomische Befunde stellen hingegen eine Gefahrenquelle für den Verbraucher dar, der mit der klassischen Fleischuntersuchung nicht begegnet werden kann (KOTTER 1996).

Bereits unter den üblichen Transportbedingungen von Schweinen zum Schlachthof erfolgt eine erhöhte Ausscheidungsrate von Salmonellen mit dem Kot (SCHULZ 1983).

EHINGER (1998) beobachtet ebenfalls bei transportbelasteten, routinemäßig geschlachteten Tieren vor allem im oberen Dünndarmabschnitt ausgeprägte Epithelablösungen, wahrscheinlich hervorgerufen durch die lokal vorhandenen Verdauungsenzyme. Im Zäkum und im Kolon werden ebenfalls größere Epithellücken festgestellt, die das Eindringen von Bakterien in die Schleimhaut erleichtern.

2.7 Allgemeine strukturelle Charakteristika und Wirkungen von Endotoxinen

Der Begriff „Endotoxin“ wird gegen Ende des 19. Jahrhunderts erstmalig erwähnt. Das Toxin stellt eine essentielle Zellwandkomponente der äußeren Membran gram-negativer Bakterien dar.

Die Endotoxine sind zwar bei allen gram-negativen Bakterien weitgehend analog aufgebaut, besitzen aber dennoch eine gewisse speziesspezifische, strukturdeterminierte Bioaktivität (RIETSCHEL u. BRADE 1992).

Biochemisch entsprechen Endotoxine einem asymmetrischen Lipopolysaccharid und über diese amphiphilen Makromoleküle ist der Mikroorganismus in der Lage, mit seiner Außenwelt in Verbindung zu treten (VAARA et al. 1984, MCCULLOUGH et al. 2000). Als exponierte Oberflächenstruktur spielen Endotoxine bei der direkten Interaktion gram-negativer Bakterien mit höheren Organismen eine wichtige Rolle. Das Erkennen der meisten eingedrungenen Keime durch das Immunsystem des Wirtes erfolgt u.a. anhand der Endotoxine im

Sinne eines „call to arms“ (VAARA et al. 1984). Darüber hinaus beeinträchtigen die Mikroorganismen in manchen Fällen mit Hilfe ihrer Lipopolysaccharide die Wirksamkeit der Phagozyten und auch des Komplementsystems (DEITCH et al. 1991, LOOS u. WASSENAAR 1994, DIKS et al. 2001).

2.7.1 Die biochemische Struktur der Endotoxine

Nach KRÜGER und RÖPKE (1997) sowie MCCULLOUGH et al. (2000) sind Endotoxine, strukturell betrachtet, Lipopolysaccharide (LPS) (Abb. 2.6, S. 24)

Die Endotoxine bestehen aus komplex phosphorylierten Heteropolysacchariden, die kovalent an ein spezifisches Lipid (Lipid A) gebunden sind. Durch diese Zusammensetzung erklärt sich auch der amphiphile Charakter der Makromoleküle: Der Lipid A-Bestandteil ist lipophil, während das Polysaccharid hydrophile Eigenschaften besitzt. An die Polysaccharide, deren O-spezifische Seitenketten (bestehend aus Oligosacchariden) für die jeweiligen Bakterienarten/Serovarietäten typisch sind und im Makroorganismus eine spezifische Immunantwort induzieren, schließt sich ein weniger variables Kern-Oligosaccharid (bestehend aus äußerer und innerer Kernregion) an, welches die Verbindung zu dem Lipid A herstellt. Das Lipid A ist die am wenigsten variable Komponente des LPS (RIETSCHEL u. BRADE 1992).

Für die biologische Aktivität des LPS-Moleküls kommt dem Lipid A entscheidende Bedeutung zu. Die einheitliche Struktur des Lipid A erklärt die vergleichbare biologische Wirksamkeit von bakteriellen Endotoxinen unterschiedlicher Herkunft. Die bestehenden Unterschiede bewirken eine Abweichung in der Stärke der Aktivität des LPS (ZÄHRINGER et al. 1994).

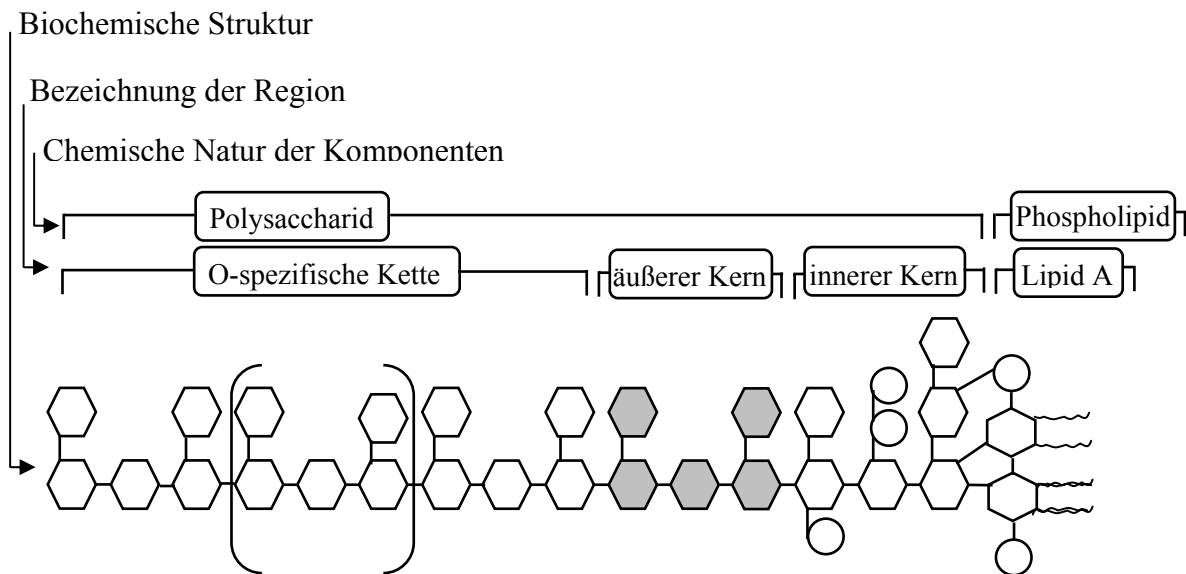


Abb. 2.6: LPS-Strukturformel (modifiziert nach RIETSCHEL et al. 1993a)

2.7.2 Untersuchungen zur Wirkung der Endotoxine auf den Makroorganismus

An der physiologischen und pathophysiologischen Interaktion mit dem Wirtsorganismus sowie an der Hemmung schädigender Einflüsse durch Komplementfaktoren und Phagozyten ist maßgeblich die äußere Membran gram-negativer Bakterien beteiligt. Für die Struktur und die Integrität dieser Membran sind Lipopolysaccharide essentiell (NIKAIDO u. VAARA 1985, MCCULLOUGH et al. 2000). Das Erkennen der eingedrungenen gram-negativen Bakterien durch das Abwehrsystem des infizierten Wirtes erfolgt anhand der Lipopolysaccharide. Für die pathophysiologischen Wirkungen im Makroorganismus sind besonders die aus dem Membranverband herausgelösten, in der Blutzirkulation befindlichen Endotoxine verantwortlich, die im Extremfall zu einem Endotoxinschock führen können (RIETSCHEL et al. 1993b). Zu weiteren pathophysiologischen Effekten werden u.a. die letale Toxizität, die Hypothermie im Ratten- und Mausmodell, die Leukopenie und die Leukozytose, die Knochenmarksnekrosen sowie die Hypotension gezählt (FREUDENBERG et al. 1993). Allerdings ist auch eine immunstimulierende Wirkung moderater Endotoxinmengen seit Jahren bekannt, wie z.B. die Wirkung als Adjuvans in Impfstoffen (immunmodulatorische Aktivität) (SINGH u. OHAGAN 2002) sowie weiterhin die Förderung der unspezifischen Abwehr gegenüber Infektionen, eine Makrophagen- und Komplementaktivierung, eine Tumor-Nekrose-Faktor α Aktivität, eine Endotoxintoleranz, die Analgesie, eine mitogene Aktivität auf B-Lymphozyten, eine Aktivierung von Endothelzellen und die Induktion des Plasminaktivators (FREUDENBERG et al. 1993, DIKS et al. 2001).

Die Induktion von Zytokinen (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor α , Interleukin I und VI, Interferone) sowie von Prostaglandinen, Thromboxan und Prostacyclin nimmt insofern eine Zwischenstellung ein, da diese Substanzen sowohl Ausdruck einer physiologischen Reaktion, aber auch Grundlage für ein Schockgeschehen mit letalem Ausgang sein können (BURELL 1994). In welchen Mengen Zytokine gebildet werden, hängt von der Endotoxinkonzentration im Blut, dem Endotoxintyp und der Reaktionsgrundlage des Wirtsorganismus ab (FREUDENBERG et al. 1993).

Für SEIDLER (1998) sowie für ZUCKER und KRÜGER (1998) scheint bei Schlachtschweinen am ehesten die Kombination mehrerer Stressoren (hohe Umgebungstemperatur, unsachgemäßes Treiben sowie längere Transportzeiten) einen fördernden Einfluss auf die Translokation von Endotoxinen und Bakterien aus dem Intestinaltrakt zu besitzen. Das Endotoxin wirkt insbesondere auf Makrophagen, Granulozyten und Endothelzellen im Sinne der Induktion einer „Akuten-Phase-Reaktion“ mit allen Folgeerscheinungen (z.B. Fieber, Granulozytose, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit) (KRÜGER u. RÖPKE 1997, IUVONE et al. 1999).

2.7.3 Untersuchungen zur Wirkung von Endotoxinen auf den Darm und auf die Caco-2 Zellkultur

Um die Wirkung von Endotoxinen auf die Darmbarriere zu analysieren, führen NOLAN et al. (1977) einige Experimente durch. Sie exenterieren das Ileum von Ratten und inkubieren die Darmschlinge für zwei Stunden mit einem E. coli-Endotoxin-Medium-Gemisch, untersuchen das Darmepithel histologisch und messen die Permeabilität anhand eines 3-O-Methyl-D-Glukose-Flusses. Die Ergebnisse zeigen sowohl morphologisch, mittels der Lichtmikroskopie, als auch funktionell keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den exenterierten Kontrolldärmen. Im Gegensatz dazu beobachten DEITCH et al. (1987) bei ihren Tests (intrapertoneale Verabreichung von E. coli-Endotoxin) an Mäusen sehr wohl Abweichungen zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Die Autoren stellen im Anschluss an eine intraperitoneale Endotoxingabe eine vermehrte, dosisabhängige Translokation der in der Darmflora physiologischerweise vorhandenen Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in die Mesenteriallymphknoten fest, die 48 Stunden nach der Endotoxinverabreichung wieder abnimmt. Weiterhin beobachten die genannten Autoren einen Anstieg der gram-negativen Enterobakterien im Zäkumlumen. Es wird vermutet, dass das Endotoxin, wenn es intraperitoneal verabreicht wird, zu einer Dysbalance der Darmflora zu Gunsten der Enterobakterien führt. In diesem Zusammenhang beobachten ASCHENBACH et al. (2003) bei von ihnen untersuchten

Schlachtschweinen mit oral verabreichtem Endotoxin von *Salmonella typhimurium* eine vermehrte bakterielle Translokation in die proximalen Jejunallymphknoten.

WELLS et al. (1993) versuchen experimentell die Auswirkung des Endotoxins auf das Darmepithel und die Interaktionen zwischen Darmbakterien, Endotoxinen und intestinalen Zellen mit Hilfe kultivierter Epithelzellen (Caco-2 Zellkultur) zu analysieren. Im Anschluss an die Inkubation von Enterozyten mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen von *E. coli* weisen die Zellen, in Abhängigkeit von den variierenden Endotoxinkonzentrationen, keine erkennbaren Unterschiede, in ihrer Morphologie und ihrer Lebensfähigkeit auf. Auffällig ist nur der abnehmende, nicht dosisabhängige, transepitheliale elektrische Widerstand nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden.

Um zusätzlich die Empfänglichkeit der Caco-2-Zellen für Bakterien im Zusammenhang mit Lipopolysacchariden zu bestimmen, wird in einem weiteren Versuch die Zellkultur mit unterschiedlichen Bakterien (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Proteus mirabilis* und *Enterococcus faecalis*) beimpft, wobei einige Zelllinien mit *E. coli*-LPS präinkubiert und anderen das Endotoxin von *E. coli* erst im Anschluss an die bakterielle Infektion zugeführt wird. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie können alle untersuchten Erreger sowohl auf als auch in den Zellen beobachtet werden. Mittels der durchgeführten Analysen lassen sich in den untersuchten Zelllinien keine Veränderungen in Bezug auf die Morphologie und die Lebensfähigkeit der Zellen erkennen. Das Endotoxin von *E. coli* scheint also die Aufnahme der Bakterien in die Zellen nicht zu erleichtern, unabhängig davon, ob es vor oder im Anschluss an eine bakterielle Infektion im Darmlumen auftritt (WELLS et al. 1993).

2.8 Rotaviren

2.8.1 Taxonomie, Morphologie und Replikation

Rotaviren sind unbehüllte RNA-Viren und gehören zu der Familie der Reoviridae. Im Transmissionselektronenmikroskop ist die typische radartige Struktur erkennbar, welche für die Namensgebung (lat. „rota“=Rad) verantwortlich war. Der Durchmesser der Viruspartikel beträgt, wenn die äußere Kapsidlage vorhanden ist, 65 bis 75 nm, und wenn diese fehlt 55 bis 65 nm. Rotaviren mit der äußeren Kapsidlage sind infektiös und vermehren sich im Zytoplasma (VANREGENMORTEL et al. 2000, KAADEN 2002). Die Vermehrung eines Virus wird durch sein Genom, die RNA gesteuert. Die RNA enthält alle Informationen für die Synthese von weiteren Viren. Damit diese Informationen in der Zelle aktiv werden können, muss nach der Penetration in die Zelle das Virusgenom freigesetzt werden. Neues Virus wird dann nicht

als Ganzes, sondern zunächst in Form seiner Bestandteile (Nukleinsäuren, Proteine) in biochemischen Prozessen synthetisiert, schrittweise zusammengebaut und schließlich aus der Zelle freigesetzt (BÜTTNER 2002). Es werden sechs Serogruppen (A bis F) mit zahlreichen Serotypen innerhalb der Gruppen unterschieden. Bei den Rotaviren der Gruppe A ist eine wechselseitige Übertragung zwischen verschiedenen Spezies (inkl. Mensch) möglich. Innerhalb der Gruppe A werden bei humanen Rotaviren zwei VP6 Subgruppen (VP=Virusprotein) und 11 Serotypen nachgewiesen (VANREGENMORTEL et al. 2000, KAADEN 2002).

2.8.2 Rotavirusinfektionen bei unterschiedlichen Spezies unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse beim Schwein

Rotaviren sind weltweit verbreitet und alle epidemiologischen Untersuchungsergebnisse weisen auf einen hohen Durchseuchungsgrad sowohl bei Tieren als auch beim Menschen hin (KAADEN 2002). Die Erreger besitzen bei allen Spezies eine starke Affinität zu den ausdifferenzierten Epithelzellen des Dünndarmes (MEBUS u. NEWMAN 1977, MCADARAGH et al. 1980, KAADEN 2002) und sie verursachen bei einigen Spezies (z.B. Mensch, Schwein), besonders bei Neonaten, schwere, potentiell letal verlaufende Durchfälle (KAADEN 2002).

Die Inkubationszeit einer Rotavirusinfektion schwankt zwischen 16 Stunden beim Schwein und 40 Stunden bei Mäusen (MEBUS u. NEWMAN 1977, MCADARAGH et al. 1980, KAADEN 2002).

Für eine Rotavirusinfektion empfänglich sind Individuen aller Altersstufen, das Virusreservoir stellen vermutlich ältere, klinisch inapparent infizierte Tiere dar (KAADEN 2002). Die Replikation der Rotaviren im Darmepithel des Dünndarmes führt zu einer Dysfunktion der Zellen, zu einer Zottenatrophie und letztendlich zum Zelltod. Die degenerativen Veränderungen beinhalten eine Zell-, Mitochondrien- und Kernschwellung, wobei der Grad dieser Veränderungen von dem Alter der Tiere abhängig ist (bei jungen Tieren sind die Alterationen stärker ausgeprägt) (PAUL u. STEVENSON 1992). Das Rotavirustoxin NSP4 bewirkt eine Steigerung der *tight junction*-Permeabilität und es kommt zu einer Aktivierung des luminalen Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanals, zu einem vermehrten Chlorid- und Wasserausstrom in das Darmlumen (KUNZELMANN u. MALL 2002) und somit klinisch zu einer Diarrhoe (SEIBERT et al. 1999, BREVES u. DIENER 2000).

Bei experimentell oral infizierten gnotobiotischen Ferkeln können NARITA et al. (1982) lichtmikroskopisch 24 Stunden post infectionem (p.i.) eine Degeneration der Mikrovilli im Jejunum und im Ileum feststellen. Transmissionselektronenmikroskopisch sind 18 Stunden

p.i. zahlreiche Viruspartikel in den Epithelzellen zu beobachten und 24 Stunden p.i. erscheinen die Mikrovilli kurz und irregulär.

Generell ist die Anzüchtung von Rotaviren schwierig und gelingt in der Regel nur bei wenigen Spezies (Rind, Schwein) bzw. erst nach Adaptation an Zellkulturen (LIEBERMANN 1992). Alle Virusisolate vermehren sich am besten in der embryonalen Rhesusaffennierenzelllinie MA-104 (KAADEN 2002).

2.8.3 Die Wirkung von Rotaviren auf die Caco-2 Zelllinie

KITAMOTO et al. (1991) und JOURDAN et al. (1995) beobachten bei einem Versuch mit Rotaviren vom Rhesusaffen und dem humanen Rotavirus, dass Rotaviren *in-vivo* einen spezifischen Tropismus zum Dünndarm zeigen. *In-vitro* nach 18stündiger Inkubation sind die Rotaviren sowohl in undifferenzierten (fünf Tage alt) als auch in differenzierten (15 Tage alt) Caco-2 Zellen erkennbar. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass bei einer Rotavirusinfektion der Caco-2 Zelllinie die Penetration nicht von der Zelldifferenzierung abhängig ist. Basierend auf diesen Ergebnissen inkubieren DICKMAN et al. (2000) eine fünf Tage alte Caco-2 Zellkultur mit Rhesusaffen-Rotavirus für acht bis 24 Stunden. Sie beobachten eine Destruktion der *tight junctions* und einen Verlust des transepithelialen elektrischen Widerstandes, was als Hinweis für eine metabolische Dysfunktion angesehen wird. Anzeichen eines Zellunterganges werden jedoch nicht beobachtet. Bei einer 14 bis 16 Tage alten Caco-2 Zellkultur (16- bzw. 18stündige Inkubation mit Rotaviren) spricht die Abnahme des transepithelialen elektrischen Widerstandes der mit Rotaviren infizierten Zellen sowie der Nachweis von Viruspartikeln mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen für eine virale Replikation (SVENNISON et al 1991, OBERT et al. 2000). 24 Stunden p.i. fällt bei den *tight junctions* eine beginnende Zerstörung auf, die sich nach 36 Stunden verstärkt hat, die *Zonula adhaerens* bleiben hingegen unverändert (OBERT et al. 2000).

2.9 Salmonellen

2.9.1 Geschichte und Taxonomie der Salmonellen

Der Erreger des Typhus wurde 1880 erstmals mikroskopisch nachgewiesen und einige Jahre später angezüchtet. Im Kauffmann-White-Schema wird das Genus *Salmonella* aufgeführt und innerhalb dieses Schemas werden die *Salmonella*-Serovare in sieben Subspezies eingeteilt (Tab. 2.3, S. 29), die sich serologisch, genetisch und biochemisch voneinander unterscheiden (DEDIE et al. 1993, SELBITZ 2002).

Die Serovare werden, basierend auf zwei Antigengruppen, den in der Zellwand lokalisierten O-Antigenen und den mit den Geißeln verbundenen H-Antigenen, serologisch differenziert. Alle zur Gattung *Salmonella* gehörigen Isolate können so über ihre Antigenformel eingeordnet werden, dabei werden die Serovare nach ihrem Haupt-O-Antigen in O-Gruppen eingeteilt. Zurzeit umfasst das regelmäßig durch Supplemente aktualisierte Kauffmann-White-Schema ungefähr 2500 serologisch definierte *Salmonella*-Serovare (DEDIE et al. 1993, SELBITZ 2002).

Tab. 2.3: Übersicht zu den Spezies und Subspezies der Gattung *Salmonella* (modifiziert nach POPOFF et al. 2000)

Spezies	Subspezies	frühere Bezeichnung	Anzahl der Serovare
S. enterica	spp. enterica	spp. I	1443
	spp. salamae	spp. II	488
	spp. arizonae	spp. III a	94
	spp. diarizonae	spp. III b	323
	spp. houtenae	spp. IV	70
	spp. indica	spp. VI	11
S. bongori		spp. bongori spp. V	20

Legende: S. *Salmonella*

2.9.2 Morphologie der Salmonellen

Das Genus *Salmonella* gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae und lässt sich mit Hilfe seiner biochemischen Eigenschaften und seines Wachstums in unterschiedlichen Medien von den übrigen 30 Genera der Enterobacteriaceae abgrenzen (PIETZSCH 1981, DEDIE et al. 1993).

Salmonellen sind gram-negative, sporenlose und bis auf wenige Ausnahmen frei bewegliche, 0,7 bis 1,5 x 2,0 bis 5,0 µm große, plumpe, begeißelte Stäbchen. Sie besitzen eine stark gewellte, äußere Membran mit elektronendichtem Flaum und eine innere Membran, die sich der Form der äußeren Membran anpasst (JOHANNESSEN 1980). Sie wachsen aerob und fakultativ anaerob, besitzen thermostabile O-Antigene (Bestandteile des LPS-Komplexes) und ther-

molabile H-Antigene (DEDIE et al. 1993). Letztere sind Geißel-Antigene, die nur von beweglichen Erregern exprimiert werden. Die Geißeln stellen ultrastrukturell fadenförmige, kontraktile Gebilde dar, die in der äußeren Zytoplasmamembran verankert sind und entweder an den Längsseiten oder allseits inserieren und zudem eine ausgeprägte Antigenität besitzen (SELBITZ 2002).

Transmissionselektronenmikroskopisch werden Fimbrien (Pili = filamentöse, unbewegliche Anhänge aus Protein (Pilin)) beobachtet, welche als starre Gebilde oder in gewundener Form von der Bakterienoberfläche ausgehen und wesentlich kleiner als die Geißeln sind. Ihre pathogenetische Bedeutung bei Salmonellen ist bisher nicht (wie bei *E. coli*) charakterisiert worden, es ist jedoch zu vermuten, dass sie gemeinsam mit den Enterotoxinen bei allen Enteritis-verursachenden Salmonellen vorkommen (SELBITZ 2002).

2.9.3 Pathogenitätsmechanismen der Salmonellen

Die zentrale Eigenschaft der Salmonellenpathogenität ist die Fähigkeit der Bakterien, sich im Dünndarm zu vermehren (LOOS u. WASSENAAR 1994) und in M-Zellen, in Enterozyten und in Becherzellen einzudringen (MEYERHOLZ et al. 2002). Die Erreger können eine Diarrhoe und/oder eine systemische Erkrankung bei einer Vielzahl von Säugetieren und beim Menschen, besonders bei Kindern, älteren und immundefizienten Personen auslösen (DEDIE et al. 1993, LOOS u. WASSENAAR 1994). Der Mensch infiziert sich in der Regel oral, z.B. über kontaminierte Lebensmittel. Die primären Infektionsquellen sind dabei insbesondere Lebensmittel (SELBITZ et al. 1995, LOOS u. WASSENAAR 1994), die von Geflügel, Rindern und Schweinen stammen, wobei die Tiere in den seltensten Fällen klinisch erkrankt sind. Salmonellen werden in fettreichen Lebensmitteln während der Magenpassage vom Fett umhüllt und sind dadurch vor der Einwirkung der Magensäure geschützt (SELBITZ et al. 1995).

Der, für die Entstehung einer Diarrhoe oder einer Infektionskrankheit durch Salmonellen (Salmonellose), wichtige Kontakt mit der Mukosa des Ileums und des Kolons wird durch die Fimbrien der Bakterienoberfläche hergestellt (DUGUID et al. 1976, LINDQUIST et al. 1987). Für die Aufnahme in die Zelle besitzen die Salmonellen in ihrer Membran ein so genanntes Typ III Sekretionssystem (Abb. 2.7, S.31) (ZHOU et al. 2001), welches unterschiedliche Substrate (z.B. SopB, SopE und SopE2) beinhaltet. Diese, aus dem Typ III Sekretionssystem austretenden Proteine, sind verantwortlich für die bakterielle Internalisation in die Enterozyten und die Entstehung einer meist darauf folgenden Diarrhoe. SopE und SopE2 aktivieren die GTPasen Cdc42 und Rac direkt, während eine Aktivierung der GTPase Cdc42

über SopB nicht bewiesen ist (ZHOU et al. 2001). Die Aktivierung von Cdc42 und Rac führen zu einer reversiblen Veränderung der Zellmembran und die Salmonellen können in die Zelle aufgenommen werden (ZHOU et al. 2001). CLARK et al. (2003) beobachten im Zusammenhang mit einer bakteriellen Translokation eine Verminderung des zellulären ATP-Gehaltes.

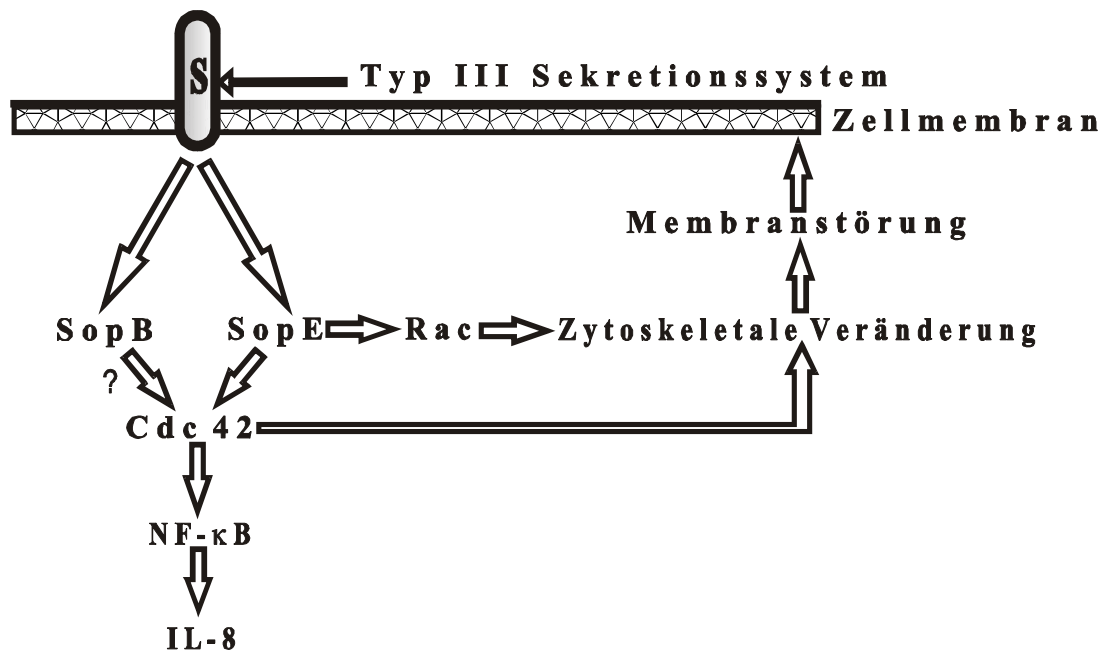


Abb. 2.7: Schematische Darstellung des Pathomechanismus von *Salmonella typhimurium* eine Membranveränderung an den Enterozyten auszulösen, in die Zelle einzudringen und über den Transformationsfaktors NF-κB Interleukin-8 zu aktivieren (modifiziert nach GALAN 1999)

Während der Penetration durch den Mikrovillisaum bildet sich eine Vakuole um das Bakterium (Abb. 2.8, S. 33) (PACE et al. 1993, OKADA 2003). Die physiologischerweise nachweisbaren Oberflächenmoleküle der Antigen-präsentierenden Vakuolen sind in den *Salmonella typhimurium* beinhaltenden Vakuolen nur unzureichend vorhanden, so dass eine lysosomale Fusion sowie eine Verdauung von Salmonellen in den Lysosomen nicht stattfinden kann. Die Bakterien werden daher über Exozytose an der Basalmembran wieder freigesetzt (FINLAY 1994), ohne morphologische Veränderungen innerhalb des Enterozyten auszulösen (REED et al. 1986, WELLS et al. 1993). Im Gegensatz dazu entdecken WELLS et al. (1993) und MEYERHOLZ et al. (2002) Bakterien nicht nur membrangebunden, sondern auch frei im Zytoplasma (Abb. 2.8, S. 33) liegend. Treten die Erreger über den junctionalen Komplex ein,

liegen sie entweder zwischen den *tight junctions* (Abb. 2.8, S. 33), den *intermediate junctions* oder den *Desmosomen* (MEYERHOLZ et al. 2002), eingeschlossen in eine von den benachbarten Zellen gebildeten Vakuole (WELLS et al. 1993).

In der Zelle führen die Salmonellen, durch die Aktivierung von Cdc42, zu einer Stimulierung weiterer Proteine, z.B. des Transformationsfaktors NF- κ B (EAVES-PYLES et al. 1999), was eine Expression von Interleukin-8 nach sich zieht (GALAN 1999). Dies induziert einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (KUNZELMANN u. MALL 2002), es kommt zu einer indirekten Cl^- -Sekretion und somit zu einem vermehrten Wasserausstrom aus der Zelle, woraus aus klinischer Sicht eine Diarrhoe resultiert (siehe Pathophysiologie des Chlorid- und des Wassertransportes, Kap. 2.2.1.1, S. 6) (SEIBERT et al. 1999, BREVES u. DIENER 2000).

Interleukin-8 gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen und ist in die Entstehung einer akuten invasiven Gastroenteritis involviert und wird zudem, wie einige andere Zytokine, von den intestinalen Epithelzellen infolge eines viralen (BASS 1997), bakteriellen (MCCORMICK et al. 1993) oder chronisch entzündlichen Stimulus (VANDULLEMEN et al. 1997) sezerniert (VAISMAN et al. 2003). Interleukin-8 führt im Anschluss an seine lokale „Freisetzung“ zur Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen und intraepithelialen Lymphozyten (BAGGIABIHI 1993), die maßgebend an der Entzündungsreaktion beteiligt sind.

Weiterhin können Salmonellen lokal im intestinalen Gewebe verbleiben und sind dann in den Enterozyten sowie in Phagosomen liegend erkennbar (OKADA 2003), oder aber auch in der Submukosa, der Lamina propria und den Endothelzellen zu finden. Die Erreger können zusätzlich, wie von TAKEUCHI (1967) beobachtet, die epitheliale Barriere des Dünndarmes penetrieren, über die Submukosa weiter zu den Lymphknoten, in die Leber und in die Milz translozieren und sind somit imstande, lokale und/oder systemische Erkrankungen bei Mensch und Tier auszulösen.

Bei Schweinen sind die am häufigsten isolierten Salmonellen die Serotypen *Salmonella choleraesuis* und *Salmonella typhimurium* (SCHWARTZ 1991, 1999). *Salmonella choleraesuis* ist an das Schwein adaptiert und führt zu einer Septikämie, *Salmonella typhimurium* dagegen ist nicht an das Schwein adaptiert und führt zu einer Enterokolitis. Die Infektion mit *Salmonella choleraesuis* beim Schwein ist eine schwere Erkrankung mit einer hohen Mortalität, im Gegensatz zu Infektionen mit *Salmonella typhimurium* (BÄUMLER et al. 2000).

Erkrankungen, die durch *Salmonella typhimurium* hervorgerufen werden, zeigen meist einen

milden klinischen Verlauf und führen zu einer selbstheilenden Diarrhoe. Dies weisen WOOD et al. (1989) im Anschluss an einen Infektionsversuch mit *Salmonella typhimurium* bei Schweinen nach. Dagegen kann *Salmonella choleraesuis* in der zweiten Trächtigkeitshälfte einen Abort (SELBITZ 2002) und bei jungen Schweinen im Absatzalter eine Septikämie mit Milz- und Lymphknotenschwellung hervorrufen (DEDIE et al. 1993).

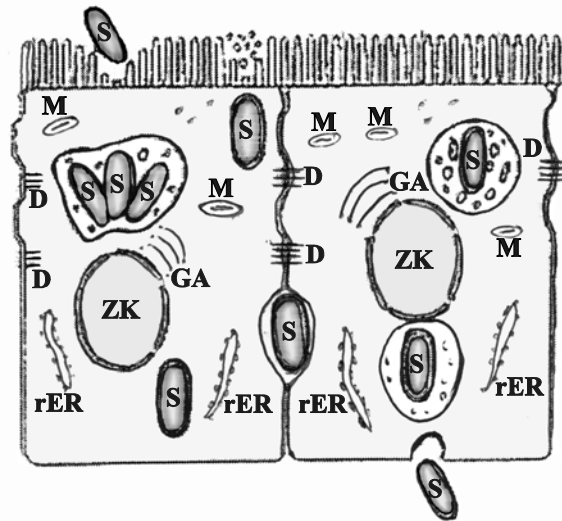


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Adhäsion, Penetration und Translokation von *Salmonella typhimurium* (S), durch die Epithelzellen in die darunter liegenden Strukturen. Die Salmonellen befinden sich frei oder in Vakuolen liegend in den Enterozyten. Die Zellkerne (ZK), die Mitochondrien (M), die Desmosomen (D), das raue endoplasmatische Retikulum (rER) und der Golgi-Apparat (GA) sind unverändert (modifiziert nach GIANELLA 1996)

2.9.4 Mechanismen der Interaktion von Salmonellen und Epithelzellen *in-vitro* und *in-vivo*

Salmonellen besitzen die Fähigkeit, an Zellen einer Nierenepithelzelllinie (FINLAY u. FALKOW 1990) oder an Makrophagen (SCHRÖDER 2002) anzuhaften und nachfolgend in die Zelle einzudringen. Bei ihren Versuchen mit der Caco-2 Zelllinie stellen FINLAY und FALKOW (1990) weiterhin fest, dass *Salmonella choleraesuis* und *Salmonella typhimurium* innerhalb von zwei Stunden von der apikalen auf die basale Seite (in das basolaterale Medium) wandern. Nach drei bis vier Stunden sinkt der transepitheliale elektrische Widerstand der Zellen und nach sechs Stunden ist schließlich die Integrität der Zelllinie gestört.

In einem *in-vitro* Versuch mit Enterozyten vom Schwein entdecken ISAACSON und KINSEL (1992) einen adhäsiven und einen nicht-adhäsiven Phänotyp von *Salmonella typhimurium*. Die Entstehung der beiden Phänotypen scheint von der Anzüchtung in Kulturmedien

mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen abhängig zu sein. Das Anhaften von *Salmonella typhimurium* an die Enterozyten ist zeitabhängig, die maximale Bindung (Attachment) erfolgt nach einer Stunde (37° C) mit signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Typen. Während die Anheftung des adhäsiven Phänotyps nach drei Stunden geringgradig ansteigt, ist diese bei den nicht-adhäsiven Erregern nur unwesentlich vermehrt (Abb. 2.9). Im Gegensatz zu den nicht-adhäsiven Salmonellen sind, anhand der Elektronenmikroskopie, bei den adhäsiven Salmonellen Pili zu erkennen. Beide Phänotypen besitzen Geißeln, weshalb den Pili eine gesonderte Rolle bei der Adhäsion und der Invasion zugesprochen wird (ISAACSON u. KINSEL 1992).

Salmonellen/Epithelzelle

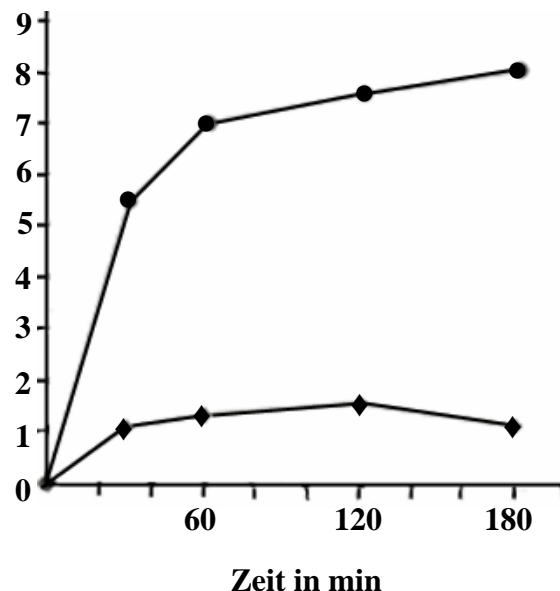


Abb. 2.9 Zeitabhängiges *in-vitro* Attachment von Salmonellen an Enterozyten vom Schwein.
 ● adhäsiver und ◆ nicht adhäsiver Phänotyp von *Salmonella typhimurium* (ISAACSON u. KINSEL 1992)

Salmonella typhimurium und *Salmonella typhi* haften (vermutlich mittels ihrer adhäsiven Pili) im exenterierten Darm (sog. „loops“) von Mäusen zuerst an den M-Zellen des follikelassoziierten Epithels (KOHATA et al. 1986, CLARK et al. 1994, JONES et al. 1994) und im Anschluss daran erfolgt erst die Adhäsion an die Enterozyten (TAKEUCHI 1967).

Genetische Analysen an *Salmonella* Spezies und *E. coli* zeigen bei *in-vitro* Studien, dass pathogene, invasive Bakterien Gensequenzen besitzen, die für eine Aufnahme in die Epithelzelle von Bedeutung sind. Überträgt man diese Gene auf apathogene, nicht-invasive Stämme, ent-

wickeln die Erreger dadurch die Fähigkeit, in eine Zelle einzudringen (ELSINGHORST et al. 1989, GALAN u. CURTISS 1989). Unterschiedliche Umweltbedingungen können die Expression genetischer Untereinheiten bei vielen Darmbakterien beeinflussen (HIGGINS et al. 1990, DORMAN 1991).

2.10 Sekundärinfektionen

2.10.1 Bakterielle Sekundärinfektionen nach einer Virusinfektion bei unterschiedlichen Spezies unter besonderer Berücksichtigung des Darmtraktes

Virusinfektionen werden bei allen Spezies durch Mischinfektionen mit anderen enteropathogenen Erregern kompliziert. So führt zum Beispiel ein synergetisches Zusammenwirken von Rotaviren mit Coronaviren sowie enterotoxischen *E. coli* (ETEC) oder Kryptosporidien zu besonders schweren klinischen Verlaufsformen (KAADEN 2002).

LECCE et al. (1982) stellen fest, dass die Rotaviren das Epithel des Dünndarmes bei abgesetzten Ferkeln schädigen, sie entwickeln klinisch eine Diarrhoe mit einer anschließenden Dysbakterie zu Gunsten der *E. coli*.

SNODGRASS et al. (1982) diagnostizieren ebenfalls bei sechs Tage alten Kälbern, die oral mit Rotaviren und *E. coli* infiziert werden, dass eine Rotavirusinfektion nötig ist, um *E. coli* eine Kolonisation im Darm zu ermöglichen. Die Ausprägung der Diarrhoe, hervorgerufen durch diese Sekundärinfektion, und die histologischen Befunde am Darmtrakt entsprechen laut ihren Untersuchungen denen der jeweiligen Monoinfektion mit Rotaviren bzw. mit *E. coli*.

Bei einem Fütterungsversuch werden vier Wochen alte Ferkel einer Rotavirusinfektion ausgesetzt und vier Tage später erfolgt eine Sekundärinfektion mit *E. coli*. Der auftretende Durchfall ist, im Gegensatz zu den von SNODGRASS et al. (1982) beschriebenen Ergebnissen, schwerwiegender als bei einer Monoinfektion und zwei bis drei Tage im Anschluss an die Sekundärinfektion sterben alle Ferkel innerhalb dieser hier aufgeführten Studie (TZIPORI et al. 1980).

2.10.2 *In-vitro*-Beobachtungen bei Sekundärinfektionen an verschiedenen Zelllinien

Mehrere Studien legen dar, dass eine virale Infektion kultivierter Epithelzellen eine intrazelluläre Aufnahme von enteropathogenen Bakterien fördert (BUKHOLM u. DEGRE 1984, KONKEL u. JOENS 1990, MODALSLI et al. 1995). SUPERTI et al. (1996) beobachten in ihrem Versuch mit der Caco-2 Zellkultur eine signifikante Steigerung von intraepithelial auf-

genommenen Bakterien (*Listeria monocytogenes*) sowie deren Vermehrung bei mit Rotavirus präinfizierten Zellen, während Polioviren nur einen schwachen Anstieg der Bakterienaufnahme induzieren. DIBIASE et al. (2000) erhalten ähnliche Resultate, bei denen sich die intrazelluläre Aufnahme mit *Yersinia* spp. stark erhöht, sobald die Zellen der Caco-2 Zelllinie zuvor mit Rotaviren infiziert wurden.

Es besteht eine spezifische Interaktion zwischen mit Rotaviren infizierten Zellen und fakultativ enteropathogenen Bakterien (BUKHOLM 1988). Bei *Salmonella typhimurium* kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Invasivität, wenn die embryonale Rhesusaffennierenzelllinie (MA-104) 48 Stunden lang mit Rotaviren präinkubiert wird, bei *Shigella flexneri* tritt sie erst 72 Stunden nach der Rotavirusinfektion auf, wobei aber durch die Viren kein zytopathogener Effekt aufgezeigt werden kann. Zwei nicht enteropathogene Stämme von *E. coli* zeigen keine Invasivität in mit Viren vorbehandelten MA-104 Zellen (BUKHOLM 1988).

3. Material und Methoden

3.1 Caco-2 Zellkultur/Infektion

Die Versuche an der Caco-2 Zellkultur wurden in Kooperation und unter Nutzung des Labors in der „Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere“ (BFAV) in Jena durchgeführt.

3.1.1 Die Caco-2 Zellkultur

Die verwendete Caco-2 Zelllinie stammt von einem humanen Kolonkarzinom (Fa. Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig).

Die unterschiedlichen Versuche (Beimpfung der Caco-2 Zellkultur mit LPS, Rotaviren, Salmonellen sowie mit Rotaviren und Salmonellen (Abb. 3.2, S. 38)) erfolgten an den Passagen 12 bis 49 (Fa. DSMZ, Braunschweig) mit einer Zellkonzentration von 1×10^5 /ml Medium. Für die Herstellung des verwendeten Mediums wurden dem Standardmedium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Fa. Life Technologies, Karlsruhe), 10% fetales Kälberserum (FKS, Fa. Sigma, Taufkirchen) und 1% nicht essentielle Aminosäuren (NEAS, Fa. Sigma, Taufkirchen) zugesetzt. Jedes Well der 24 Well-Platten (Fa. Merck Eurolab, Dresden) (Abb. 3.1) wurde mit 0,6 ml des fertigen Mediums („basales“ Medium) beschickt und anschließend 0,6 cm² großen Millicell®-Einsätze (Fa. Millipore, Eschborn) (Abb. 3.1, Inset) mit Isopore Polykarbonat-Membranen (Porendurchmesser: 3 µm) eingesetzt. Zum Schluss wurden 0,3 ml der Zellsuspension vorsichtig auf die Membran („luminales“ Medium) aufpipettiert.

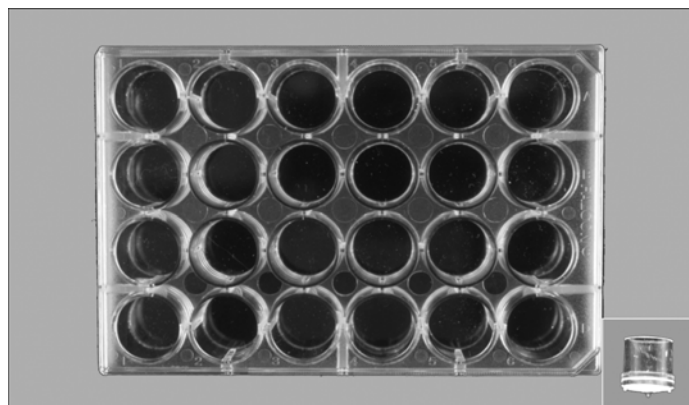


Abb. 3.1: 24 Well-Platte, Inset: Einsatz für die 24 Well-Platte

Eine Beobachtung des Zellwachstums in den Millicell®-Einsätzen innerhalb der 24 Well-Platten war während des Versuchsdurchganges nicht möglich. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Zellen einen geschlossenen Monolayer gebildet haben, da der während des Waschens benutzte PBS⁺-Puffer (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig) sich auf dem angewachsenen Zellrasen sammelte und somit kein Flüssigkeitsdurchtritt in das basale Medium erfolgte.

Das Medium ist von rotvioletter Farbe und schlägt bei Verunreinigung, z.B. durch Erreger, nach gelb um. Daher war eine grobsinnliche Kontrolle hinsichtlich einer Kontamination der Zelllinie mit unerwünschten Keimen während der Versuche möglich.

Die Subkultivierung erfolgte entsprechend der Angaben in Kapitel 9.1, S. 121.

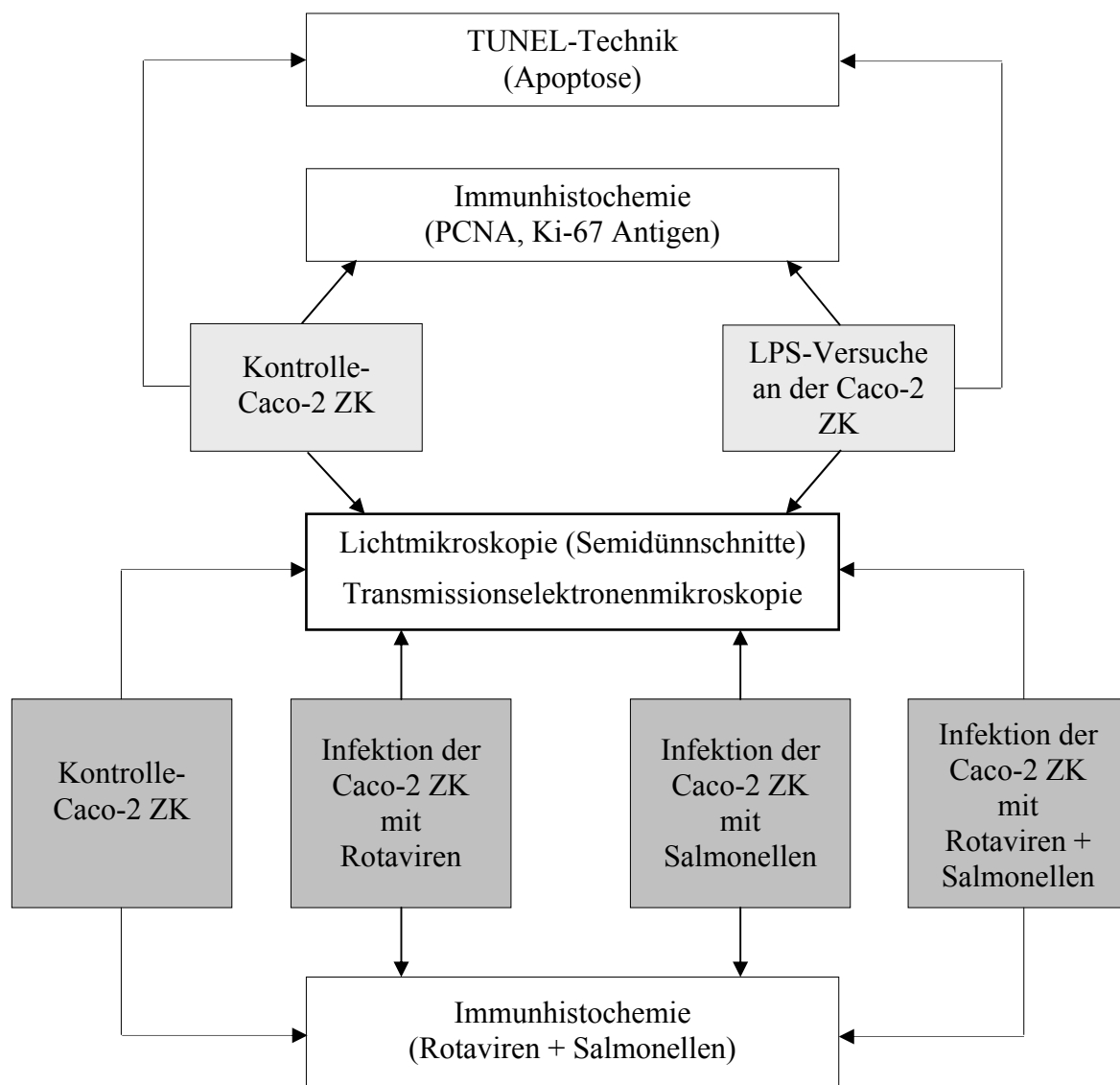


Abb. 3.2: Material- und Methodenübersicht

Legende: ZK=Zellkultur

3.1.2 *Salmonella typhimurium*-LPS

Das für die eigenen LPS-Versuche (I-IV, vgl. Kapitel 3.1.3) und für die Fütterungsversuche der Schweine des Graduiertenkollegs (Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig) verwendete Endotoxin wurde vom Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig zur Verfügung gestellt.

Das LPS stammte von der Firma Felgenträger & Co. (Impfstoffwerk Dessau-Tornau). Die Kultivierung/Hitzeinaktivierung des LPS erfolgte bei 100°C für eine Stunde. Die Bestimmung des Endotoxingehaltes (1,1 mg/ml) übernahm die Firma Biocontrol in Holzhausen.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung – Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Salmonellen (NRL-Salm) – in Berlin bestätigte, dass die LPS-Proben von einem Isolat *Salmonella typhimurium* DT104 stammten.

3.1.3 LPS-Versuche I-IV

Die **LPS-Versuche I–IV** (Abb. 3.3) wurden an der 12.-49. Passage der Caco-2 Zellkultur durchgeführt.

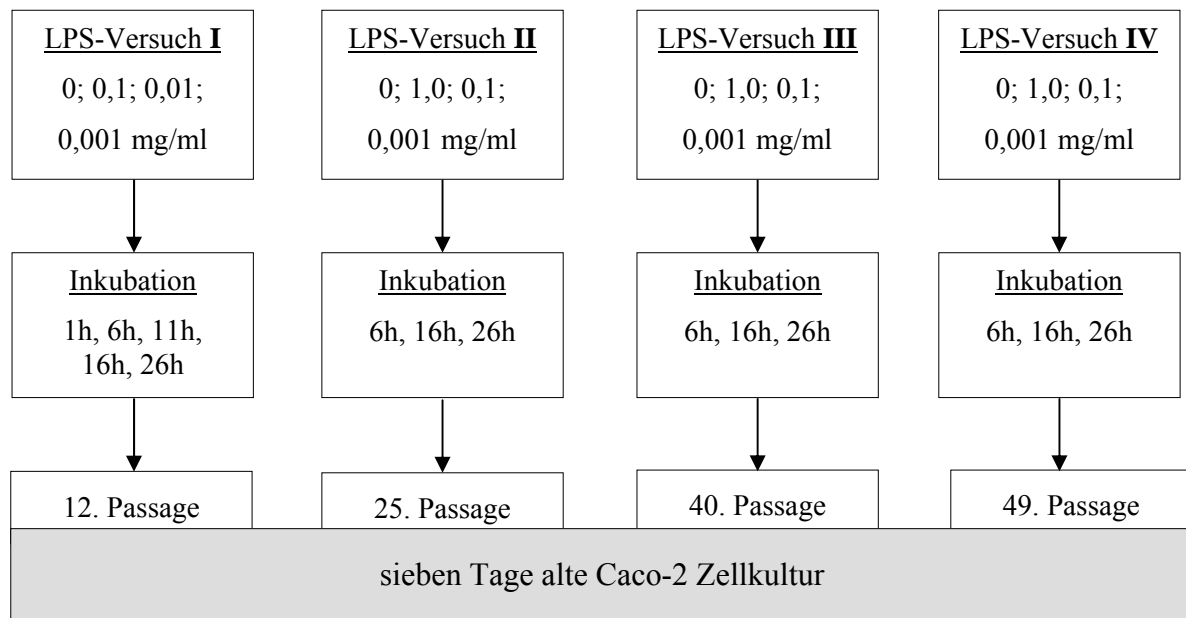


Abb. 3.3: Material- und Methodenübersicht zu den LPS-Versuchen hinsichtlich der unterschiedlichen *S. typhimurium*-LPS-Konzentrationen (mg/ml) mit variierender Expositionszeit (Stunden) an der sieben Tage alten Caco-2 Zellkultur (12./25./40./49. Passage)

Nach einer Wachstumsdauer von sieben Tagen in Millicell®-Einsätzen bei 37°C und einer 5% igen CO₂-Konzentration, erfolgte die Entnahme des auf dem Zellrasen befindlichen („luminalen“) Mediums und das Waschen (1x) der Proben mit 0,3 ml PBS⁺-Puffer. Das konzentrierte LPS von *Salmonella typhimurium* wurde mittels des hergestellten Mediums von 1,1 mg/ml auf 1,0; 0,1; 0,01 und 0,001 mg/ml verdünnt, auf die Zellkultur aufgetragen und für jeweils eine Stunde, sechs Stunden, 11 Stunden, 16 Stunden oder 26 Stunden bei 37°C und bei einer 5% igen CO₂-Konzentration inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte das Absaugen des LPS-Gemisches und das Waschen (1x) mit jeweils 0,3 ml PBS⁺-Puffer mit nachfolgender Fixierung der kompletten Millicell®-Einsätze (n=56) in 4% igem neutralem gepuffertem Formalin bzw. in 3% igem Glutaraldehyd (n=56).

3.1.4 Infektionsversuche

Die **Infektionsversuche A-C** (Abb. 3.4, S. 41; Tab. 3.1, S. 42 und Tab. 3.2, S. 43) wurden ebenfalls mit der Caco-2 Zellkultur durchgeführt. Nach einem Wachstum von sieben Tagen (25. und 40. Passage) bzw. von 14 Tagen (39. und 41. Passage) in Millicell®-Einsätzen in 24 Well-Platten, erfolgte die Inkubation bei 37°C und einer 5% igen CO₂-Konzentration mit:

- je 0,4 ml Rotavirus-Lösung ($1 \times 10^{5,3}$ KID₅₀/ml) (KID=Kolonieinfektionsdosis) (bereitgestellt von H.-J. Streckert, Ruhr-Universität Bochum) für 17 bzw. 72 Stunden, oder
- je 0,4 ml *Salmonella typhimurium*-Lösung (1×10^6 KBE/ml) (BFAV, Jena) für drei bzw. fünf Stunden, oder
- je 0,4 ml Rotavirus-Lösung ($1 \times 10^{5,3}$ KID₅₀/ml) (H.-J. Streckert, Ruhr-Universität Bochum) für 17 bzw. 72 Stunden und einer anschließenden Sekundärinfektion durch 0,4 ml *Salmonella typhimurium*-Lösung (1×10^6 KBE/ml) (BFAV, Jena) für jeweils drei bzw. fünf Stunden.

Anschließend wurden alle Proben in 4% igem neutralem gepuffertem Formalin (n=54), in 3% igem Glutaraldehyd (n=54) bzw. in 4% igem Paraformaldehyd (n=54) fixiert.

Infektion der Caco-2 Zellkultur mit Rotaviren

Nach dem Absaugen des Mediums von der sieben bzw. 14 Tage alten Zellkultur und nach dem Waschen (1x) mit jeweils 0,3 ml PBS⁺ erfolgte das Beimpfen der mit PBS⁺ verdünnten und mit 40 µl Trypsinlösung (zur Virusaktivierung) angereicherten Virus Stammlösung mit

anschließender Inkubation für eine Stunde bei 37°C bei 5% iger CO₂-Konzentration. Zum Schluss wurde die Virussuspension abpipettiert, die Caco-2 Zellen einmal mit PBS⁺ gewaschen und für 17 bzw. 72 Stunden mit einer Trypsin-Mediumlösung inkubiert (Rezept und Bezugsquelle s. Kapitel 9.3, S. 122).

Infektion der Caco-2 Zellkultur mit *Salmonella typhimurium*

Die Salmonellen-Stammlösung wurde mittels des hergestellten Mediums auf eine Konzentration von 1x10⁶ KBE/ml eingestellt und anschließend auf die mit 0,3 ml PBS⁺ gewaschenen (1 x), sieben bzw. 14 Tage alte Zellkultur aufpipettiert und für drei bzw. fünf Stunden im Brutschrank bei 37°C und einer 5% igen CO₂-Konzentration inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte das Spülen (1x) aller Proben mit PBS⁺-Puffer (Rezept und Bezugsquelle s. Kapitel 9.4, S. 122).

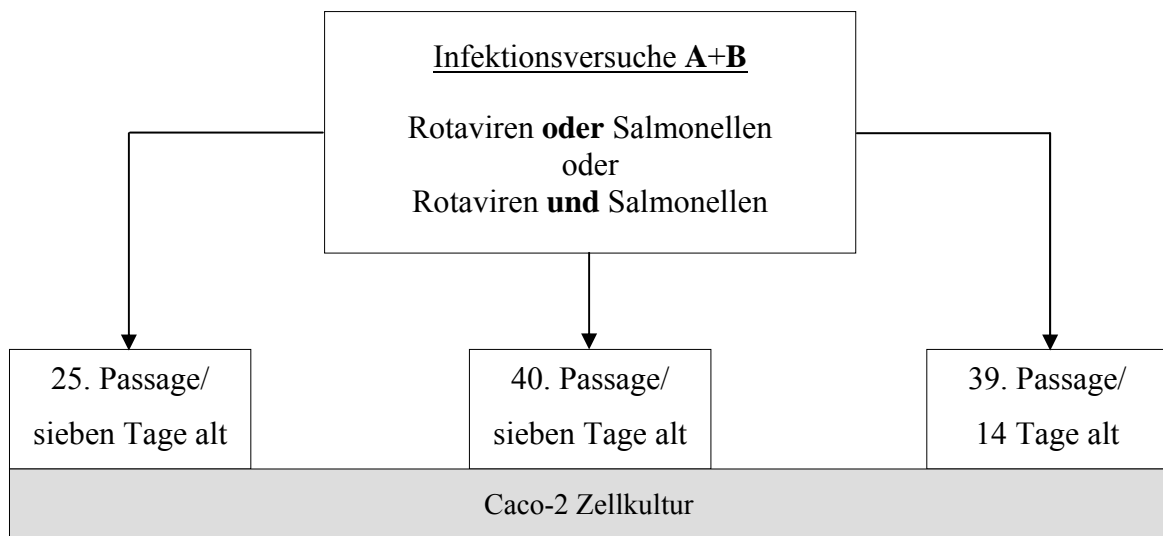


Abb. 3.4: Material- und Methodenübersicht zu den Infektionsversuchen **A** und **B**; Konzentrationen und Inkubationszeiten s. Tab. 3.1, S. 42

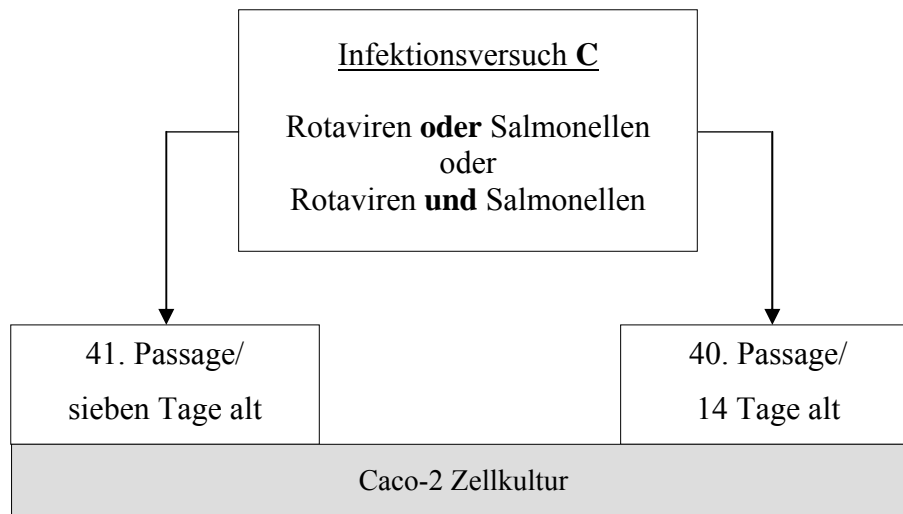


Abb. 3.5: Material- und Methodenübersicht zu dem Infektionsversuch **C**; Konzentrationen und Inkubationszeiten, s. Tab. 3.2, S. 43

Für die **Infektionsversuche A und B** (Tab. 3.1) sind gleiche Erregerkonzentrationen und Expositionszeiten verwendet worden und daher gemeinsam in einer Tabelle aufgeführt.

Tab.: 3.1: Versuchsdurchführung mit einer **sieben Tage** alten Zellkultur (Infektionsversuch A: 25. Passage), einer **sieben Tage** alten Zellkultur (Infektionsversuch B: 40. Passage) und einer **14 Tage** alten Zellkultur (Infektionsversuch B: 39. Passage)

Inkubationsdauer der Keime	Keimkonzentration			
	Kontrolle	Rotaviren	S. typhimurium	Rotaviren + S. typhimurium
17 Stunden	0	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml	---	---
3 Stunden	0	---	1×10^6 KBE/ml	---
17 Stunden ¹ + 3 Stunden ²	0	---	---	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml 1×10^6 KBE/ml

(KID=Kolonieinfektionsdosis, KBE=Kolonien bildende Einheit)

Legende zu Tab. 3.1: ¹ Inkubation mit Rotaviren ² Inkubation mit Salmonellen

Im **Infektionsversuch C** sind an der sieben Tage alten und der 14 Tage alten Zellkultur die gleichen Erregerkonzentrationen und Expositionszeiten verwendet und darum in der unten dargestellten Tabelle zusammengefasst worden.

Tab.: 3.2: Versuchsdurchführung mit einer **sieben Tage** alten Zellkultur (Infektionsversuch C: Passage 41) und einer **14 Tage** alten Zellkultur (Infektionsversuch C: Passage 40)

Inkubationsdauer der Keime	Keimkonzentration			
	Kontrolle	Rotaviren	S. typhimurium	Rotaviren + S. typhimurium
3 Stunden	0	---	1×10^6 KBE/ml	---
5 Stunden	0	---	1×10^6 KBE/ml	---
17 Stunden	0	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml	---	---
72 Stunden	0	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml	---	---
17 Stunden + 3 Stunden	0	---	---	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml 1×10^6 KBE/ml
17 Stunden + 5 Stunden	0	---	---	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml 1×10^6 KBE/ml
72 Stunden + 3 Stunden	0	---	---	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml 1×10^6 KBE/ml
72 Stunden + 5 Stunden	0	---	---	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml 1×10^6 KBE/ml
17 Stunden ¹ + 3 Stunden ²	0	---	---	$1 \times 10^{5,3}$ KID ₅₀ /ml 1×10^6 KBE/ml

(KID=Kolonieinfektionsdosis, KBE=Kolonien bildende Einheit)

Legende zu Tab. 3.2: ¹ Inkubation mit Rotaviren ² Inkubation mit Salmonellen

3.2 Immunhistologische und transmissionselektronenmikroskopische Präparation

3.2.1 Präparation für die Immunhistologie und die TUNEL-Technik

Ausgewählte, vollständige Millicell[®]-Einsätze (n=12 des LPS-Versuches) wurden sofort nach der Entnahme in 4% igem neutralem gepuffertem Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert, die Membran aus dem Einsatz ausgeschnitten und in Paraplast (Fa. Vogel, Gießen) nach dem Standardverfahren im Hypercenter XP (Fa. Shandon, Frankfurt) eingebettet. Von diesen Paraplastblöcken sind mit Hilfe des Schlittenmikrotoms (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf beschichtete SuperFrost[®] Plus-Objektträger (Fa. Vogel GmbH & CoKG, Gießen) aufgezogen und entsprechend der Rezepte (Immunhistologie: Kapitel 9.5, S. 122; TUNEL-Technik: Kapitel 9.7, S. 126) weiterbehandelt worden.

Immunhistologische Methoden

An repräsentativ ausgewählten Schnitten der Caco-2 Zellkultur wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt.

Die Darstellung der Expression der Proliferationsmarker Ki-67 Antigen (Kapitel 9.6, S. 125) (n=14 des LPS-Versuches) und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Kapitel 9.6, S. 125) (n=14 des LPS-Versuches), sowie der Nachweis von Rotaviren (Kapitel 9.6, S. 125) (n=4) und von Salmonellen (Kapitel 9.6, S. 125) (n=4) erfolgte mittels der PAP-Technik (Peroxidase anti-Peroxidase) (Rezept, Bezugsquellen s. Kapitel 9.5, S. 122).

Positiv- und Negativkontrollen für die Immunhistologie

Als *Positivkontrolle* diente für das Ki-67 Antigen und das PCNA eine in der Routinediagnostik verwendete Endometriumbiopsie, für die Salmonellen-Antikörper eine infizierte Makrophagenzelllinie (Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig) und für das Rotavirus-Antigen ein mit Rotaviren infizierter Darm von einem Kalb aus der Routinediagnostik des Landeslabors Schleswig-Holstein, Neumünster.

Als *Negativkontrollen* wurden jeweils parallel mit Kaninchen-Kontrollserum bzw. mit einem monoklonalen Antikörper gegen Hühner-Bursa-Lymphozyten (HIRSCHBERGER 1987) inkubierte Schnitte verwendet.

Auswertung der Immunhistologie

Die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mittels eines Standardmikroskops der Fa. OLYMPUS unter Verwendung der 4er, 10er und der 40er Vergrößerung.

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune Reaktionsprodukte gewertet, die im Kontrollschnitt nicht nachweisbar waren (homogen hell-beige Färbungen erfuhren eine negative Bewertung).

Ki-67 Antigen und PCNA zeigen ein intranukleäres Reaktionsmuster, während die Rotaviren und die Salmonellen intrazytoplasmatisch auftreten.

TUNEL Technik

Mit Hilfe der TUNEL-Technik („Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labelling“) erfolgte an ausgewählten Schnitten (n=12 des LPS-Versuches) der Nachweis apoptotischer Zellen durch die TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase, 25U/25µl, Boehringer Mannheim) vermittelte 3'-OH-dUTP- (3'-Hydroxy-desoxy-Uridintriphosphat) End-Markierung, die gezielt fragmentierte DNA nachweist (modifiziert nach GAVRIELI et al. 1992) (Rezept, Bezugsquellen und Positivkontrolle s. Kapitel 9.7, S. 126).

3.2.2 Präparation und Auswertung der Semidünnschnitte

Für die Beurteilung der Semidünnschnitte erfolgte die Fixation der vollständigen Einsätze (Fa. Millipore, Eschborn) in 3% igem Glutaraldehyd (Fa. Plano, Wetzlar). Die Membran wurde mit einem Skalpell aus dem Einsatz herausgetrennt, in ca. 4 x 1,5 mm große Streifen geschnitten, drei- bis viermal mit 0,1 M Cacodylatpuffer (Fa. Roth, Karlsruhe) gespült und zwei Stunden mit 1% cacodylatgepuffertem Osmiumtetroxid (Fa. Plano, Wetzlar) bei 4°C nachfixiert. Es folgte ein zweimaliges kurzes Spülen in 0,1 M Cacodylatpuffer mit anschließendem Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe. Die Flacheinbettung wurde in Glycidether 100 (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) nach einem standardisierten Verfahren vorgenommen.

Für die orientierende Lichtmikroskopie sind von den zugetrimmten Blöcken 0,3-0,5 µm dicke Semidünnschnitte mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Fa. Leica, Bensheim) hergestellt und diese mit 1% iger Toluidinblau-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) angefärbt worden.

Die lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate erfolgte mittels eines Standardmikroskops der Fa. OLYMPUS unter Verwendung der 4er, 10er, 40er und 100er (mit Immersion Öl) Vergrößerung. Die von jeder Probe (n=110) hergestellten Semidünnschnitte sind mit der 100er Vergrößerung bezüglich der Morphologie der Zelllinie und der Zellen untersucht und jeweils

drei der vier vorhandenen Lokalisationen (von den Semidünnschnitten) für die transmissions-elektronenmikroskopische Auswertung ausgewählt worden.

3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopische Präparation und Auswertung

Die entsprechenden Blöcke der für die Transmissionselektronenmikroskopie ausgewählten Proben wurden anschließend mit einer Rasierklinge angetrimmt. Die mit Hilfe eines Diamantmessers (Diatom, Leica Vertrieb GmbH, Stuttgart) 60-90 nm dicken Ultradünnschnitte sind auf mit Formvar (Fa. Serva, Heidelberg) befilmte Kupfernetze (Fa. Tesla, Brno, Slowakei) aufgezogen worden. Die Doppelkontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte mit 2,5% igem Uranylazetat (7 min) und 2 % igem Bleizitrat (10 min), dazwischen wurden die Kupfernetze mit Aqua bidest. abgespült und auf Filterpapier getrocknet (REYNOLDS 1963).

Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) bei 80 kV und 3000-250.000 facher Gerätevergrößerung. Als Aufnahmematerial dienten Kodak Electron Microscope Filme (Kodak co. 4489, Rochester, NY, USA). Die Negative wurden in einer Entwicklerlösung (Kodak D19 von Plano W, Fa. Plannet GmbH, Wetzlar) 4 min. bei 20°C entwickelt, ca. 10 min. fixiert, ca. 30 min. in Leitungswasser gewässert und bei Raumtemperatur getrocknet. Mittels eines Belichtungsautomaten (Durst Labor 1200, Fa. Durst GmbH, Brixen) sind die Negative auf schwarz/weiß Fotopapier (TT Speed, Fa. Tetenal Photowerk GmbH & Co, Norderstedt) abgezogen worden. Die Entwicklung erfolgte in 1:9 verdünntem Fotopapierentwickler (Eukobrom, Tetenal Photowerk GmbH & Co., Norderstedt). Anschließend wurden die Bilder 5 min. bei Raumtemperatur fixiert, ca. 30 min. in Leitungswasser gewässert und mit einem RC-Trockner 30 (Fa. Kindermann & Co GmbH, Ochsenfurt) getrocknet.

Mit Hilfe einer Messlupe (Fa. Zeiss, Jena) mit integrierter Skala (1 cm) erfolgte am Negativ das Ausmessen zellulärer Strukturen, deren tatsächliche Größe anhand der folgenden Formel berechnet wurden:

$$\text{Größe in nm: } X = \frac{\text{Skalenwert in cm}}{\text{Bildgröße*}} \times 1.000.000$$

* die Bildgröße wird aus der von der Firma Zeiss veröffentlichten, gerätespezifischen Vergrößerungstabelle ermittelt

3.2.4 Berechnung der Mittelwerte und Mittelwertabweichungen

Die mittels der Licht- und der Transmissionselektronenmikroskopie erhaltenen Daten sind mit Hilfe des Mittelwertes und der Mittelwertabweichung zusammengefasst und verglichen worden.

Die nachfolgend in den Ergebnissen dargestellten Daten sind überwiegend aus Gründen der Übersichtlichkeit auf ganze Zahlen auf- bzw. abgerundet worden.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen werden teilweise in Tabellenform dargestellt. Die wichtigsten Befunde sind in den Tabellen grau hinterlegt.

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Kapitel werden zunächst die Definitionen der Begriffe Zellalter und Passage aufgeführt.

Wenn *in-vitro* innerhalb der Kulturschalen der Boden von den Zellen vollständig bedeckt ist, wachsen die strikt adhärenen Zelllinien in der Regel nicht mehr weiter, was zum Absterben der Kultur führen kann. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Zellen nach erreichter Maximaldichte zu „verdünnen“. Dies geschieht durch das „Passagieren“ der Zellen, d.h. die Zellen werden unter „Verdünnung“ aus ihrem Kulturgefäß in ein neues überführt und man erhält eine weitere Passage (LINDL 1999). Bei den umgesetzten Zellen beginnt man das Zellalter neu zu definieren, d.h. die Zellen, die sich seit einer Woche in dem neuen Kulturgefäß befinden, sind sieben Tage alt (LINDL 1999).

4.1 Morphologische Charakterisierung der Caco-2 Zellkultur

Die von einem Kolonkarzinom abstammende Caco-2 Zellkultur zeigt ein autonomes Wachstum. Die einzelnen Zellen sind gut differenziert und lediglich durch eine gering- bis mittelgradige Anisozytose gekennzeichnet.

Eine Typisierung hinsichtlich eines organoiden bzw. nicht organoiden Gewebeaufbaus wird nicht vorgenommen, da die Caco-2 Zellkultur nur aus Epithelzellen besteht.

Die Zellkerngröße und -form der Caco-2 Zellen variiert nur geringgradig. Das Kern-Plasma-verhältnis ist zu Gunsten des Kernes verschoben. Mitosefiguren treten vereinzelt auf. Atypische Kernteilungsfiguren sind nicht nachweisbar.

4.2 Morphologie der Kontroll-Zellkulturen

Da die Zellmorphologie, bezogen auf das Alter der Kulturen (sieben und 14 Tage) und der Passagen (12. P. - 49. P.) bei allen 41 Kontroll-Zellkulturen aus den LPS- und den Infektionsversuchen, weder licht- noch transmissionselektronenmikroskopisch signifikante Unterschiede zeigt, werden diese Befunde gemeinsam beschrieben.

4.2.1 Morphologische Befunde an Semidünnschnitten

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie zeigt sich, dass die Zellen der Zellkultur an einigen Lokalisationen durch die Poren der Membran wachsen und überwiegend kurze bis mittlere, in seltenen

Fällen lange Zellausläufer ausbilden. Zellausläufer bezeichnen Ausstülpungen des Zytoplasmas, die in die Membranpore hineinwachsen. Morphologisch ist die Kontrolllinie durch einen überwiegend gleichmäßig wachsenden, ein- bis zweischichtigen Zellrasen charakterisiert, der an der Oberfläche einen deutlichen Mikrovillibesatz aufweist.

Die Zellen zeigen ein pleomorphes Erscheinungsbild: Ein Drittel der Zellen erscheint isoprismatisch, ein Drittel der Zellen ist hochprismatisch und ein weiteres Drittel der Zellen bildet eine runde Form aus. Trotz dieser Pleomorphie erzeugen die unterschiedlichen Zellen einen weitgehend regelmäßigen Zellrasen. Der überwiegende Anteil der euchromatinreichen Kerne weist eine runde Form auf, nur ein Drittel der Zellkerne ist längsoval. Die Kerne sind meist in der Zellmitte lokalisiert, nur wenige Nuclei liegen basal oder apikal. Viele der Zellkerne zeigen unterschiedlich tiefe laterale Einkerbungen, die in ihrer Zahl variieren. Bei den sieben Tage alten Zellen besitzen je ein Viertel der Zellkerne keine, eine, zwei oder mehr Einkerbungen. Bei den 14 Tage alten Zellkulturen fallen dagegen Zellkerne mit zahlreichen Einkerbungen bei einem Drittel der Zellen auf.

Unabhängig vom Zellalter enthalten die Hälfte der Zellkerne nur ein Kernkörperchen, die andere Hälfte besitzt keine, zwei oder mehr Nucleoli. Das Kern-Plasmaverhältnis beträgt bei den sieben Tage alten Zellen 59:41 und bei den 14 Tage alten Zellen 57:43.

4.2.2 Morphologische Befunde an Ultradünnschnitten

Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf die Zellen eines einzelnen untersuchten Ultradünnschnittes. Die ultrastrukturelle Auswertung umfasst jeweils eine durchschnittliche Zellzahl von 52 Zellen.

Die bei der Beurteilung der Semidünnschnitte aufgefallenen Zellausläufer (Abb. 4.1, S. 50) sind auch elektronenmikroskopisch erkennbar (Abb. 4.2, S. 53). Die Zellen wachsen mitsamt ihren Zellorganellen in die Membranporen hinein.

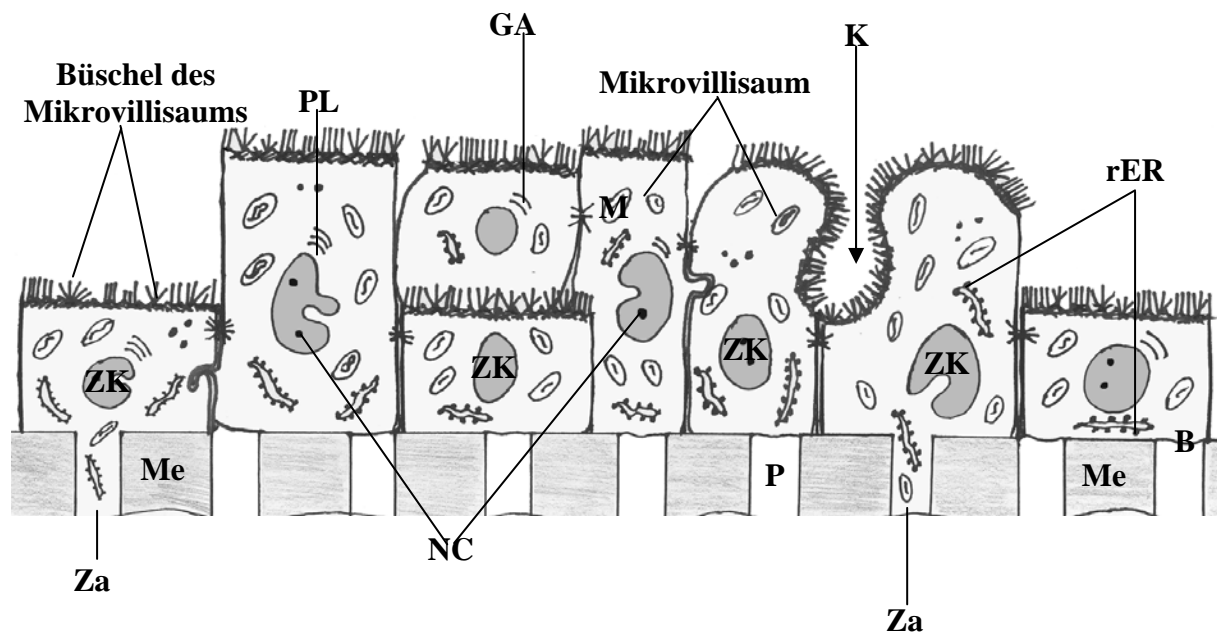


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Zellmorphologie der untersuchten ein- bis zweischichtigen Kontroll-Zellkultur, die vereinzelt in die Poren (**P**) der Membran (**Me**) einwächst und Zellausläufer (**Za**) bildet: Es fallen iso-, hochprismatische und runde Zellen mit z.T. eingekerbten Zellkernen (**ZK**) und einigen Nucleoli (**NC**) auf. In einigen Lokalisationen ist die Ausbildung von Kanälen (**K**) erkennbar, die mit einem **Mikrovillisaum** ausgekleidet sind. Der Mikrovillisaum bildet zu 50% so genannte „**Büschel**“ aus. Mitochondrien (**M**), raues endoplasmatisches Retikulum (**rER**), Golgi-Apparat (**GA**), Primärlysosomen (**PL**), Basalmembran (**B**)

Ultrastrukturell zeigen die Kontroll-Zellen an der Oberfläche einen irregulär wachsenden Mikrovillisaum (Abb. 4.3, S. 53). Die Mikrovilli haben eine durchschnittliche Länge von $775,5 \pm 226,2$ nm und einen Durchmesser von $99,8 \pm 8,2$ nm.

Auffällig sind weiterhin von Mikrovilli ausgekleidete Kanäle, die interzellulär zu liegen scheinen (Abb. 4.4, S. 53). Ultrastrukturell stellen sie sich im Schnitt als „Löcher“ dar, die mit einem Mikrovillisaum besetzt sind, der morphologisch dem der apikalen Zellseite entspricht. Die apikale, von Mikrovilli besetzte Zellfläche wird von den Nachbarzellen überwuchert und stellt sich im Anschluss, elektronenmikroskopisch, als Kanal dar. Diese Kanäle treten zwischen 1,2 % der Zellen auf, bezogen auf die jeweils untersuchte Probe. Der Durchmesser der untersuchten Kanäle variiert von 2,9 μ m bis 7,3 μ m (durchschnittliche Größe: 5,0 μ m) und sie liegen vornehmlich im mittleren Bereich (in Bezug auf die Epithelzellhöhe) zwischen den einzelnen Epithelzellen. Das unterschiedliche Alter der Zellen (sieben und 14 Tage) bewirkt keine Änderungen hinsichtlich der Größe und/oder der Anzahl der vorhandenen Kanäle.

Die mittels der Lichtmikroskopie schon diagnostizierten, überwiegend runden, mit einigen Einkerbungen versehenen, zentral liegenden Zellkerne sind transmissionselektronenmikroskopisch euchromatinreich. Die Hälfte der Zellen besitzt einen Nucleolus, die andere Hälfte der Zellen zeigt keine, zwei oder mehrere Kernkörperchen. Auffällig sind einzelne Kernkörperchen mit einer deutlich vergrößerten Pars amorpha (Abb. 4.5, S. 55). Diese zeigt einen elektronendichten Rand mit einem elektronenärmeren Zentrum.

In den Caco-2 Zellen sind keine morphologischen Hinweise auf eine sekretorische Tätigkeit erkennbar.

Vergleicht man die Zellgrenzen der *sieben Tage* alten Zellen mit denen der *14 Tage* alten Zellen, stellt man keine deutlichen Unterschiede fest. Der Interzellularspalt hat eine durchschnittliche Breite von $17,2 \pm 2,6$ nm. Die ein bis zwei in die Zelle hineinragenden Ausstülpungen der lateralen Zellmembran (Abb. 4.6, S. 55), die den Verlauf der Zellgrenzen kennzeichnen, sind jeweils gleich stark ausgeprägt. Auch bezüglich der Haftkomplexe ist kein Unterschied in Abhängigkeit vom Zellalter erkennbar: eine *tight junction* ist nur an jeder sechsten Zelle eindeutig wahrzunehmen, die Anzahl der *Desmosomen* (bestehend aus zwei *Halbdesmosomen*) (Abb. 4.7, S. 55) (Länge: $158,0 \pm 29,2$ nm) liegt bei zwei bis drei, und in jeder Zelle ist ein *Halbdesmosom* feststellbar.

Die Basalmembran (Abb. 4.3, S. 53) lässt sich transmissionselektronenmikroskopisch nicht in jeder Lokalisation eindeutig nachweisen und erscheint daher diskontinuierlich.

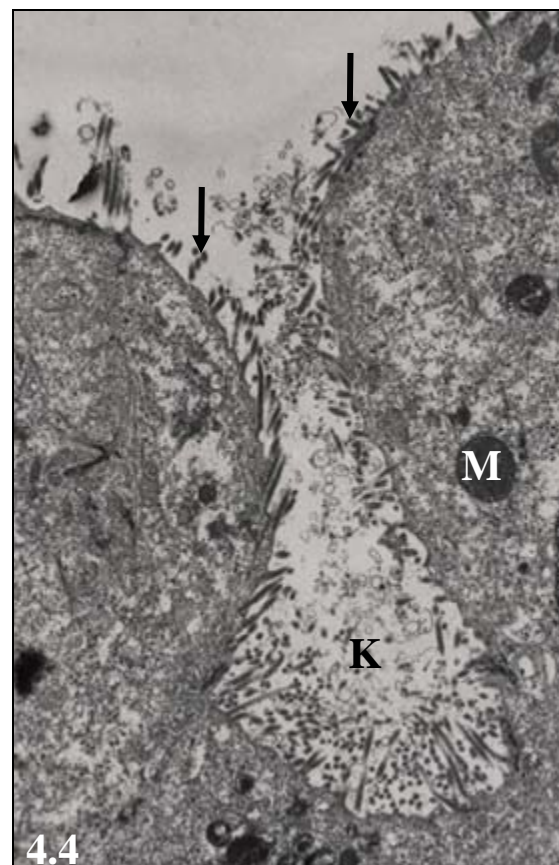
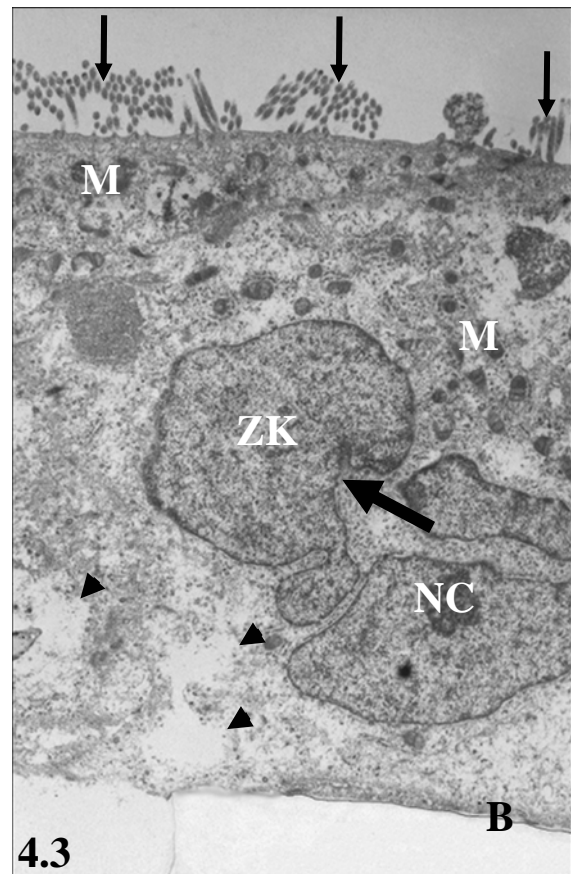
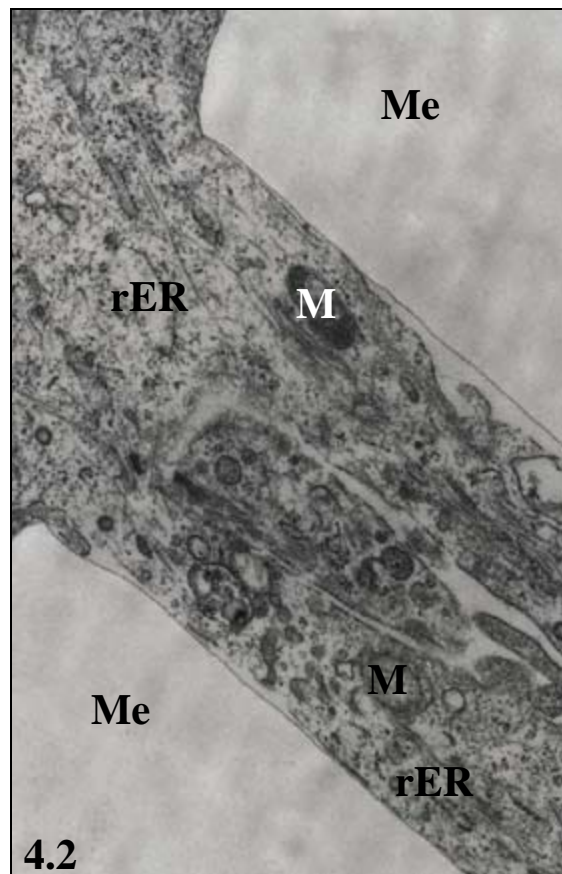
Als Anteile des Zytoskeletts der Zelle sind elektronenmikroskopisch Mikrotubuli und Mikrofilamente („terminal web“) in jeder Zelle ebenso erkennbar wie die Intermediärfilamente, die in die *Desmosomen* und *Halbdesmosomen* einstrahlen. Auftreten und Erscheinungsbild des Zytoskeletts zeigen, bezogen auf das Zellalter und die unterschiedlichen Passagen, keine Unterschiede, so dass die **Passagenanzahl in den nachfolgenden Kapiteln** hinsichtlich der morphologischen Charakterisierung **unberücksichtigt** bleibt.

Elektronenmikroskopische Befunde an den Epithelzellen einer sieben Tage alten Caco-2 Kontroll-Zellkultur

Abb. 4.2: In eine Pore der Membran (**Me**) einwachsender Zellfortsatz, in dem Mitochondrien (**M**) sowie Anteile des rauen endoplasmatischen Retikulums (**rER**) nachgewiesen werden können (TEM, Gerätevergrößerung 12000x).

Abb. 4.3: Die Epithelzellen zeigen einen irregulär wachsenden Mikrovillisaum (**dünne Pfeile**), einen zentral liegenden Zellkern (**ZK**) mit Einkerbungen (**dicker Pfeil**) und einen deutlichen Nucleolus (**NC**). Im basalen Zytoplasma sind vereinzelt optisch leere Räume, das so genannte „cloudy swelling“ (**Pfeilspitzen**) zu erkennen; (**M**) Mitochondrien, (**B**) Basalmembran (TEM, Gerätevergrößerung 4400x).

Abb. 4.4: In einigen Lokalisationen ist die Ausbildung von Kanälen (**K**) erkennbar, die mit einem Mikrovillisaum (**Pfeile**) ausgekleidet sind; (**M**) Mitochondrien (TEM, Gerätevergrößerung 4400x).

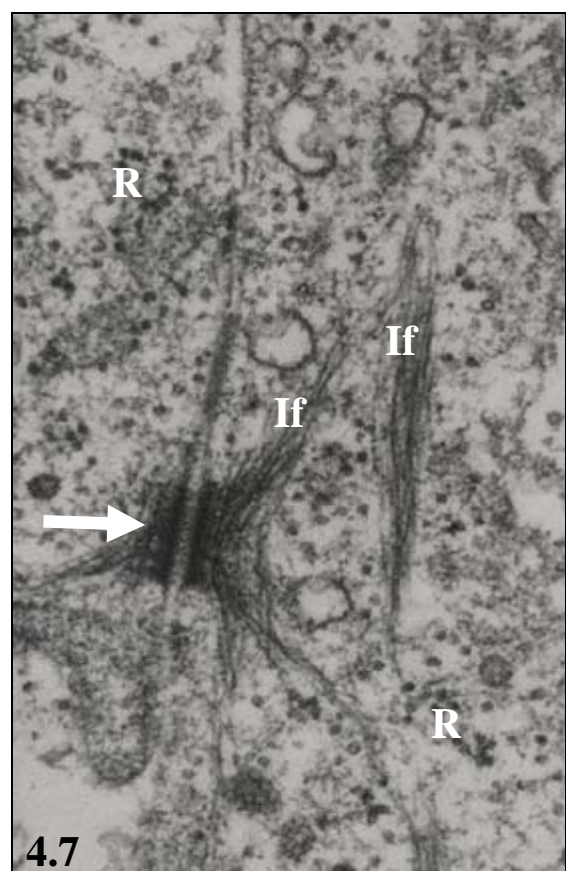
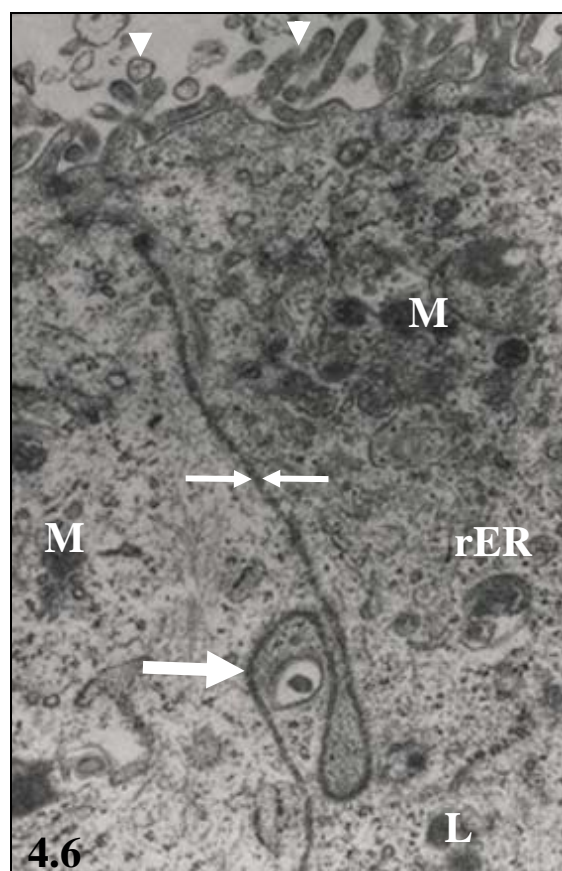
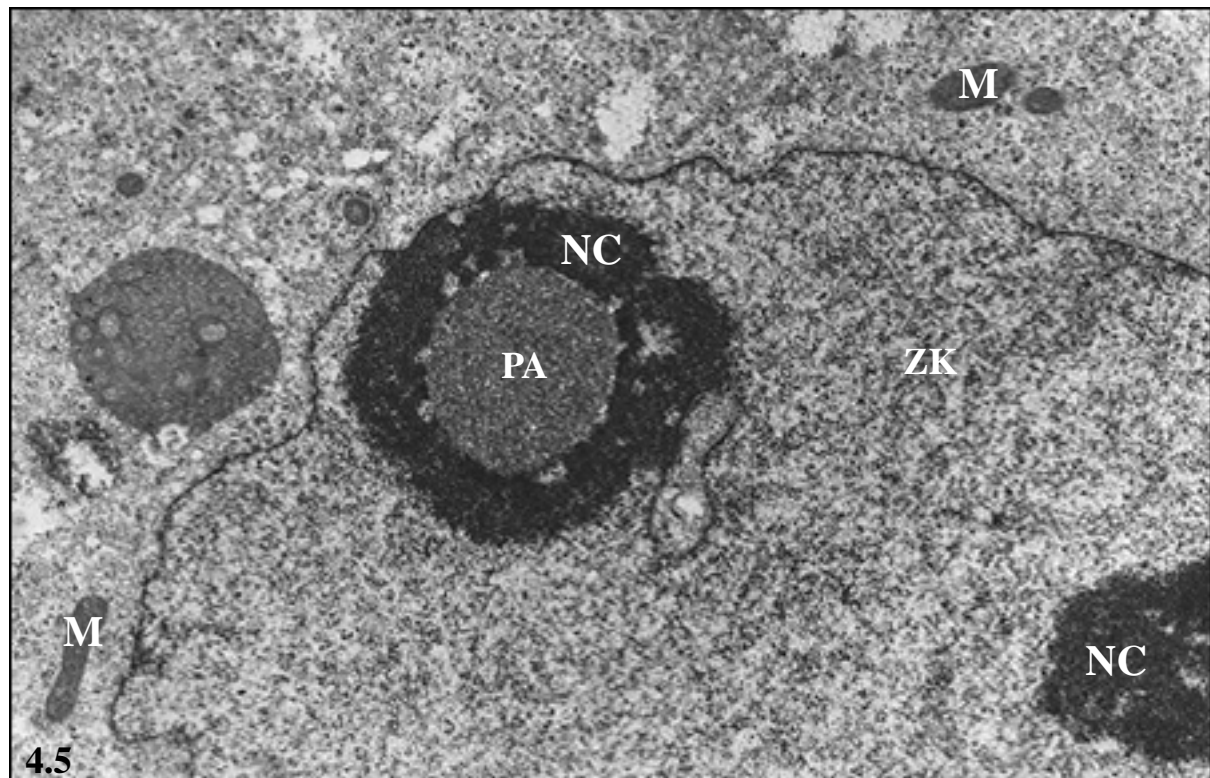


Elektronenmikroskopische Befunde an den Epithelzellen einer sieben Tage alten Caco-2 Kontroll-Zellkultur

Abb. 4.5: Gelegentlich tritt in den Nucleoli (**NC**) eine deutlich vergrößerte Pars amorph (**PA**) auf; (**M**) Mitochondrien; (**ZK**) Zellkern (TEM, Gerätevergrößerung 7000x).

Abb. 4.6: Der Interzellularspalt (**kleine Pfeile**) ist relativ eng und weist an einigen Stellen laterale Ausstülpungen (**großer Pfeil**) auf, die unterschiedlich weit in die Zelle hineinreichen; (**Pfeilspitzen**) Mikrovilli; (**M**) Mitochondrien; (**L**) Lysosomen; (**rER**) raues endoplasmatisches Retikulum (TEM, Gerätevergrößerung 12000x).

Abb. 4.7: Die Intermediärfilamente (**If**) strahlen in ein gut ausgebildetes *Desmosom* (**Pfeil**) ein; (**R**) Ribosomen (TEM, Gerätevergrößerung 50000x).



Im Zytoplasma der Kontrollzellen sind, unabhängig vom Alter der Zellkultur, vereinzelt optisch leere Räume, ein so genanntes „cloudy swelling“ (Abb. 4.3, S. 53) zu erkennen. Diese Bereiche liegen häufig im unteren Drittel der Zelle, lateral des Zellkerns.

Eine Zelle besitzt 10 bis 32 (im Durchschnitt 23) Mitochondrien vom Crista-Typ, die in der Regel im oberen Drittel der Zelle anzutreffen sind, aber vereinzelt auch in der mittleren und im unteren Drittel der Zelle auftreten.

Das endoplasmatische Retikulum (ER) durchzieht, unabhängig vom Alter der Zellkultur, als parallel angeordnete und eng beieinander liegende Zisternen das Zytoplasma und ist außen entweder mit einem Ribosomenbesatz (rER) oder ohne einen Ribosomenbesatz (gER) versehen. In einigen Fällen ist das raue ER auch konzentrisch angeordnet oder es lagern sich einzelne Zisternen eng an die Mitochondrien an.

Ein Golgi-Apparat ist in den Zellen der Caco-2 Zelllinie nicht immer eindeutig feststellbar, wobei das Zellalter hierauf keinen Einfluss besitzt.

In jeder Caco-2-Zelle treten meist $4 \pm 1,5$ Primärlysosomen (\varnothing 0,5–1 μm ; membranumhüllte, annähernd kugelförmige, enzymhaltige Zellorganellen) auf und in 35,8% der *sieben Tage* alten Zellen bzw. in 25% der *14 Tage* alten Zellen befinden sich $3,8 \pm 2,1$ Sekundärlysosomen (entstehen durch Verschmelzung mit Phagosomen und sind größer als Primärlysosomen).

Außerdem sind in einigen Zellen der Zellkultur Mitosefiguren erkennbar. Diese treten bei den *sieben Tage* alten Zellen in $1,7 \pm 0,7\%$ und bei der *14 Tage* alten Zellkultur in $3,2 \pm 0,6\%$ der Zellen auf.

4.3 Morphologie der mit LPS behandelten Zellkultur

Die mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen von *Salmonella typhimurium* behandelten und mit variierenden Expositionszeiten inkubierten Zellkulturen zeigen sowohl lichtmikroskopisch als auch transmissionselektronenmikroskopisch untereinander sowie gegenüber den Kontroll-Zellkulturen keine signifikanten morphologischen Abweichungen.

4.4 Immunhistologische Befunde und Nachweis von Apoptose

4.4.1 Nachweis von Ki-67 Antigen und von PCNA

Die Proliferationsaktivität wurde an repräsentativ ausgewählten Schnitten anhand der Expression von Ki-67 Antigen (n=31 des LPS-Versuches) und PCNA (n=30 des LPS-Versuches) untersucht. Unabhängig davon, ob es sich um eine Kontroll-Zellkultur, eine Zellkultur aus

dem LPS-Versuch oder eine Zellkultur aus dem Infektionsversuch handelt, werden von $21,5 \pm 8,7\%$ der Zellen Ki-67 Antigen (Abb.4.8, S. 58) und PCNA (Inset: Abb.4.8, S. 58) exprimiert. Beide Proliferationsmarker zeigen hinsichtlich ihres Expressionsmusters keine Unterschiede.

4.4.2 Nachweis von Apoptosen mittels TUNEL-Technik und Transmissionselektronenmikroskopie

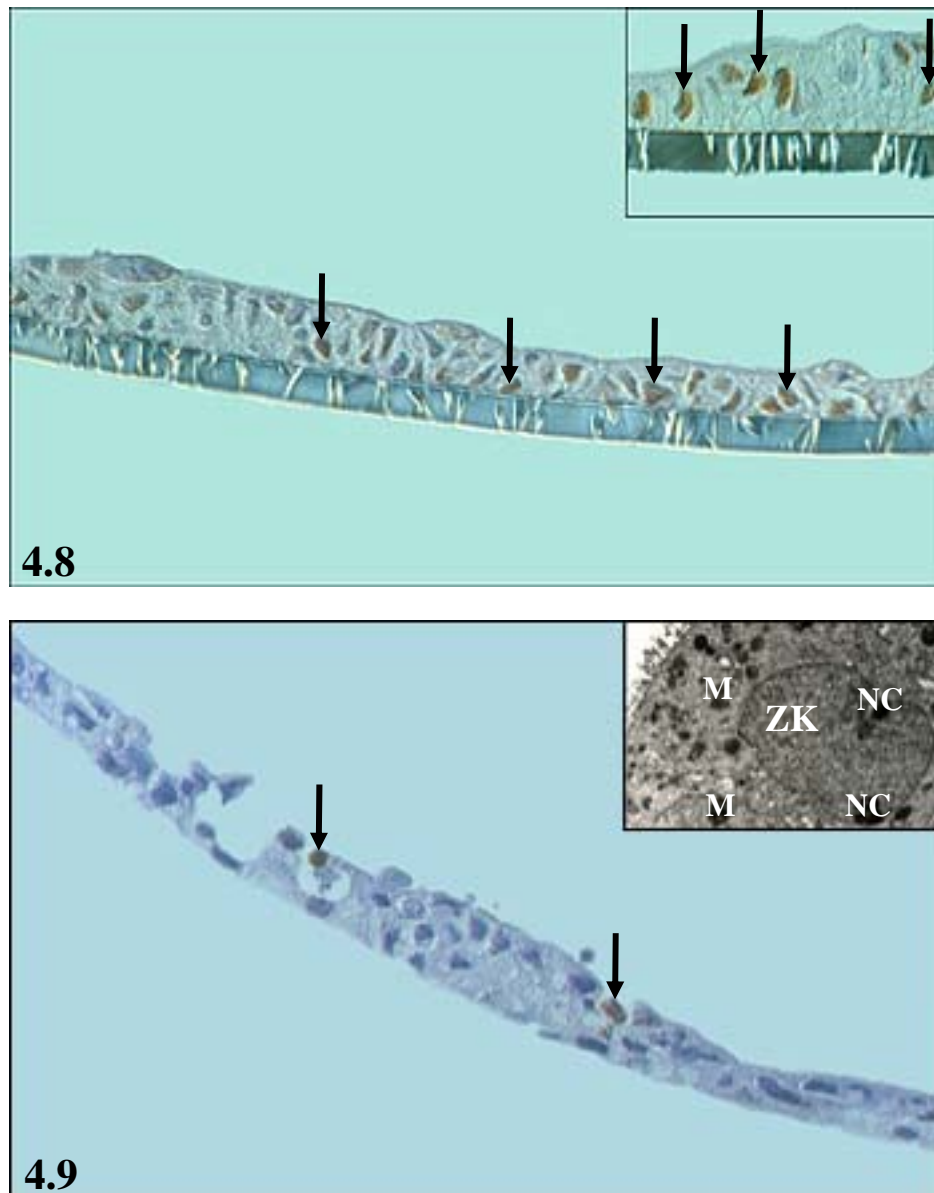
Mittels der TUNEL Technik können apoptotische Zellen bereits lichtmikroskopisch dargestellt werden (MILLER u. MARX 1998). In den ausgewählten Schnitten (n=12 des LPS-Versuches) der Kontroll-Zellkultur und der mit LPS behandelten Zellkultur ist der Vorgang der Apoptose (Abb. 4.9, S. 58) nur in einigen Zellen eindeutig erkennbar, somit scheint die Apoptose in der Zellkultur nur eine minimale Rolle zu spielen. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnten in den untersuchten Lokalisationen keine „apoptotic bodies“ (entstehen durch das „budding“ apoptotischer Zellen und stellen sich als kleine intrazelluläre runde, elektronendichte Gebilde dar, die von einem optisch leeren Raum umgeben sind) identifiziert werden.

4.5 Morphologie der Caco-2 Zellkultur im Anschluss an eine Infektion

Eine geringe Zellzahl der Caco-2 Zellkultur enthält im Anschluss an eine Inkubation mit Rotaviren, Salmonellen sowie Rotaviren und Salmonellen unterschiedlich viele Erreger (Rotaviren und Salmonellen).

4.5.1 Morphologische Befunde an Semidünnschnitten

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie können bei den infizierten Caco-2-Zellkulturen keine morphologischen Unterschiede zu den Kontroll-Zellkulturen und zu den mit LPS behandelten Zellkulturen diagnostiziert werden. Die weitere Auswertung der Rotavirusinfektion (Kapitel 4.5.2, S. 59), der Salmonelleninfektion (Kapitel 4.5.3, S. 63) und der sekundär mit Salmonellen infizierten Caco-2 Zellkultur, die zuvor mit Rotaviren inkubiert wurde (Kapitel 4.5.4, S. 68), erfolgt anhand der Transmissionselektronenmikroskopie und der Immunhistologie.



Immunhistologische Befunde und Ergebnisse der TUNEL-Technik einer sieben Tage alten Kontroll-Zellkultur aus dem LPS-Versuch

Abb. 4.8: Intranukleäre Expression des Ki-67 Antigens (**Pfeile**) in einigen sieben Tage alten Epithelzellen der Kontroll-Zellkultur. Inset: Intranukleäre Expression von PCNA (**Pfeile**) in einigen sieben Tage alten Epithelzellen der Kontroll-Zellkultur. (Immunhistologie, Ki-67 Antigen, Normarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x; Inset: Immunhistologie, PCNA, Normarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 125x).

Abb. 4.9: Nachweis von apoptotischen Zellen (**Pfeile**) mit Hilfe der TUNEL-Technik in einigen sieben Tage alten Epithelzellen der Kontroll-Zellkultur. Inset: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung einer sieben Tage alten, intakten Epithelzelle der Kontroll-Zellkultur; (**ZK**) Zellkern, (**M**) Mitochondrien, (**NC**) Nucleoli. (TUNEL-Technik, Normarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x; Inset: Transmissionselektronenmikroskopie, Gerätevergrößerung 4400x).

4.5.2 Infektion der Caco-2 Zellkultur mit Rotaviren

Sieben Tage alte Zellkulturen (25., 40. und 41. Passage) und *14 Tage* alte Zellkulturen (39. und 40. Passage) sind jeweils für 17 bzw. 72 Stunden (Expositionszeit) mit einer Rotaviruskonzentration von $1 \times 10^{5,3}$ KID₅₀/ml inkubiert worden.

Für die zeitliche Angabe der Dauer der Erregerinkubation mit der Caco-2 Zellkultur werden im Folgenden die Begriffe Expositionszeit, Inkubationszeit oder Inkubationsdauer synonym verwendet.

4.5.2.1 Morphologische Befunde an Ultradünnschnitten

Nach einer 17- bzw. 72stündigen Expositionszeit der Zellkultur mit Rotaviren (Tab. 4.1, S. 60) fallen intrazellulär runde, ca. 70 nm große Viruspartikel mit einer radartig erscheinenden Struktur auf (Abb. 4.10, S. 62), die typisch für Rotaviren ist.

Morphologisch ist die Zellkultur weiterhin durch einen überwiegend gleichmäßig wachsenden, ein- bis zweischichtigen Zellrasen charakterisiert, der an der Oberfläche einen deutlichen Mikrovillibesatz aufweist.

Bei den *7 Tage* alten Zellkulturen (25., 40. und 41. Passage) sind nach einer Expositionszeit von 17 Stunden ca. 9,0% der Zellen infiziert, bei den Caco-2 Zellen, die 72 Stunden lang inkubiert worden sind, liegt die Anzahl der infizierten Zellen bei ca. 5,6%, bei einem weiterhin gleichmäßig ausgebildeten Zellrasen. Die Erregeranzahl (Tab. 4.1, S. 60) je Zelle ist, unabhängig von der Dauer der Expositionszeit, annähernd gleich.

Bei den *14 Tage* alten Zellkulturen (39. und 40. Passage) ändert sich der Anteil der infizierten Zellen nicht, unabhängig davon, ob die Caco-2 Zellen 17 oder 72 Stunden mit Rotaviren inkubiert worden sind. Auffällig ist aber, dass die Anzahl der Rotaviren pro Zelle nach der 72stündigen Inkubation bei ca. 141 liegt, während nach der 17stündigen Inkubation ca. 344 Viruspartikel in einer Zelle nachweisbar sind.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der hier durchgeführten Versuche mittels der verwendeten Inkubationszeiten, die Expositionszeit negativ mit der Anzahl der infizierten Zellen (*sieben Tage* alte Zellen) und mit der Menge der nachweisbaren Viruspartikel pro Zelle (*14 Tage* alte Zellen) korreliert.

Tab. 4.1: Übersicht zu den Ergebnissen der Rotavirusinfektion in der Caco-2 Zellkultur

Alter der Zellkultur	Expositionszeit	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren/Zelle $\bar{x} \pm SA$
7 Tage	17 h	$9,0 \pm 0,9$	$102,5 \pm 10,5$
7 Tage	72 h	$5,6 \pm 0,8$	$96,8 \pm 8,45$
14 Tage	17 h	$10,3 \pm 2,8$	$343,5 \pm 166,5$
14 Tage	72 h	$7,1 \pm 1,1$	$140,8 \pm 7,8$

Legende zu Tab. 4.1: SA Standardabweichung

Die Rotaviren liegen zu mehreren in Vakuolen zusammengelagert oder sind frei im Zytoplasma anzutreffen (Abb. 4.11, S.62). Die Vakuolen können die Größe von Lysosomen besitzen oder die Zelle zur Hälfte ausfüllen, wobei, unabhängig von dem Zellalter und/oder der Expositionszeit, die Vakuolengröße nicht mit der Anzahl der Viren korreliert. In einigen Vakuolen zeigen sich die Rotaviren dicht aneinandergelagert, in anderen liegen sie weit auseinander. Die Viruspartikel sind innerhalb der Zellen im oberen, im mittleren oder im unteren Drittel lokalisiert: Bei den *sieben Tage* alten Zellkulturen mit kurzer Expositionszeit (17 Stunden) liegen sie überwiegend im oberen und im mittleren Drittel der Zelle und bei der Einwirkzeit von 72 Stunden befinden sie sich vornehmlich im oberen und im unteren Drittel der Zelle. In den *14 Tage* alten Zellkulturen hingegen können die Rotaviren gleichermaßen von apikal bis basal nachgewiesen werden. Es fällt auf, dass infizierte Zellen nicht unmittelbar nebeneinander liegen. Der Interzellularspalt ist, soweit elektronenmikroskopisch erkennbar, intakt und frei von Viruspartikeln.

Die Veränderungen, die eine Rotavirusinfektion in der Zelle, im Vergleich zu den Kontroll-Zellkulturen, auslöst, sind verhältnismäßig gering und abhängig von der Anzahl der Viren in der jeweiligen Zelle. Bei einer Anzahl von mehr als 100 Rotaviren je Zelle sind im Zytoplasma einiger Zellen vermehrt unscharf abgegrenzte, optisch leere Räume (sog. „cloudy swelling“) zu beobachten (Abb. 4.11, S. 62).

Die Ausprägung des Mikrovillisaums der infizierten und der nicht infizierten Zellen, innerhalb der mit Rotaviren inkubierten Zellkulturen, lässt keine Unterschiede erkennen und entspricht der in den Kontroll-Zellen.

Die nebeneinander liegenden Zisternen des rauen und des glatten endoplasmatischen Retikulums erscheinen in Zellen, die zahlreiche Viren enthalten, in einigen Bereichen gering- bis mittelgradig erweitert. In dem Zisterneninneren sind jedoch in keiner untersuchten Lokalisation Rotaviren nachweisbar. Die Ribosomen lassen morphologisch, im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, keine Veränderungen erkennen.

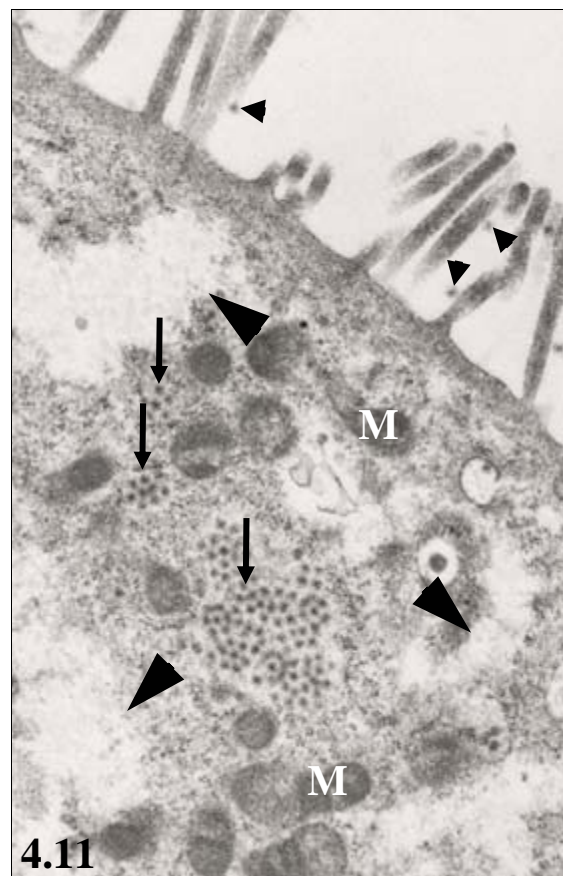
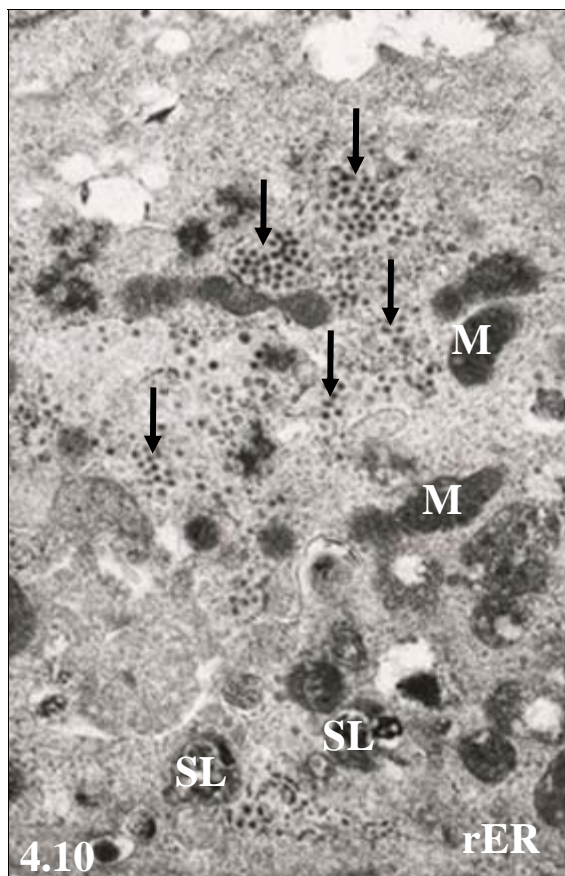
Das Zytoskelett (Mikrotubuli, Mikrofilamente und Intermediärfilamente) und die Zellorganellen einschließlich der Zellkerne entsprechen, sowohl qualitativ als auch quantitativ, den Strukturen der Kontroll-Zellen.

Mitosefiguren treten innerhalb einer mit Rotaviren infizierten Zellkultur in ca. 2% der Zellen auf, wobei sie aber nur in nicht infizierten Zellen vorkommen. Diese Befunde entsprechen damit der Mitoserate in den Kontroll-Zellkulturen.

Interzelluläre, mit Mikrovilli ausgekleidete Kanäle treten zu ca. 2,7% innerhalb einer mit Viren infizierten Zellkultur auf (Kontroll-Zellkultur: ca. 3,2%), wobei diese immer zwischen zwei Zellen auftreten, in denen keine Rotaviren nachweisbar sind. Morphologisch entsprechen die Kanäle denen der Kontroll-Zellkulturen, sie liegen im mittleren oder unteren Bereich (bezogen auf die Epithelzellhöhe) zwischen den einzelnen Epithelzellen.

Im Anschluss an eine Infektion der Caco-2 Zellkultur mit Rotaviren sind diese frei im Zytoplasma oder in Vakuolen liegend nachweisbar. Die Zellmorphologie verändert sich ansonsten jedoch nicht. Sind innerhalb einer Zelle fast zellkerngroße, Viruspartikel enthaltende Vakuolen vorhanden, ist dieses Erscheinungsbild mit dem gleichzeitigen Auftreten vieler, intrazytoplasmatischer, optisch leerer Räume assoziiert, wodurch das Zytoplasma mittel- bis hochgradig aufgelockert erscheint. Zusätzlich ist das rER in einigen Bereichen gering- bis mittelgradig dilatiert, ohne dass dort Rotaviren beobachtet werden können.

Eindeutige Kennzeichen für eine Zellschädigung (Karyopyknose, -rhexis, -lysis und/oder auch eine Desintegration der Zellmembran bzw. der Zellorganellen), die auf das Vorhandensein der Rotaviren zurückgeführt werden könnte, wurden mittels der Transmissionselektronenmikroskopie in den untersuchten Lokalisationen nicht nachgewiesen.



Elektronenmikroskopische Befunde an den Epithelzellen sieben und 14 Tage alter Caco-2 Zellen im Anschluss an eine Rotavirusinfektion

Abb. 4.10: Im Anschluss an eine 17stündige Inkubation der sieben Tage alten Caco-2 Zellkultur mit Rotaviren können intrazytoplasmatisch liegende Viruspartikel (**Pfeile**), nachgewiesen werden. Die Mitochondrien (**M**) erscheinen unverändert. Vereinzelt treten Sekundärlysosomen (**SL**) auf; (**rER**) raues endoplasmatisches Retikulum (TEM, Gerätevergrößerung 12000x).

Abb. 4.11: Neben den intrazytoplasmatisch zu beobachtenden Rotaviren (**Pfeile**) können bei der 14 Tage alten Zellkultur, die für 72 Stunden mit Rotaviren inkubiert worden ist, gelegentlich auch innerhalb des Mikrovillisaums Rotaviren (**kleine Pfeilspitzen**) nachgewiesen werden. Ein, im Vergleich zur Kontroll-Zellkultur, geringgradig vermehrt auftretendes „cloudy swelling“ (**dicke Pfeilspitzen**) ist ebenfalls erkennbar; (**M**) Mitochondrien (TEM, Gerätevergrößerung 12000x).

4.5.2.2 Immunhistologische Befunde

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers kann intrazytoplasmatisch Rotavirus-Antigen nachgewiesen werden. Die Anzahl der positiv reagierenden Zellen (infizierte Zellen) (Abb. 4.12, S. 66) entspricht in etwa den bereits aufgeführten transmissionselektronenmikroskopisch dokumentierten Ergebnissen (vgl. Kapitel 4.5.2.1, S. 59).

4.5.3 Infektion der Caco-2 Zellkultur mit Salmonellen

Sieben Tage alte Zellkulturen (25., 40. und 41. Passage) und *14 Tage* alte Zellkulturen (39. und 40. Passage) sind jeweils für drei bzw. fünf Stunden mit einer Salmonellenkonzentration von 1×10^6 KBE/ml inkubiert worden.

4.5.3.1 Morphologische Befunde an Ultradünnschnitten

Im Anschluss an eine Infektion der Caco-2 Zellen mit Salmonellen (Tab. 4.2, S. 64) fallen überwiegend intrazytoplasmatisch liegende, ca. $1,3 \times 3,5 \mu\text{m}$ große Erreger mit einer gewellten äußeren und inneren Membran auf. Darüber hinaus können die Salmonellen vereinzelt auch im Mikrovillisaum, dem Interzellularspalt zweier nicht erregerhaltiger Zellen, in den Zellausläufern einzelner Caco-2 Zellen oder im Bereich der Membranpore (wo sich keine Zellausläufer befinden) (Abb. 4.1, S. 50) nachgewiesen werden. Die Innenstruktur der Bakterien ist im Randbereich elektronendicht und erscheint zur Mitte hin etwas weniger elektronendicht (Abb. 4.13, S. 66). Die Morphologie dieser Erreger entspricht der in der Literatur aufgeführten Beschreibung von Salmonellen (Kapitel 2.9.2, S. 29).

Bei den *sieben Tage* alten Zellkulturen (25., 40. und 41. Passage) mit einer Expositionszeit von drei Stunden sind $9,7 \pm 0,2\%$ der Zellen infiziert, nach der fünfstündigen Inkubation ist die Anzahl beinahe unverändert ($7,9 \pm 2,1\%$ erregerhaltiger Zellen). Die Zahl infizierter Zellen in der *14 Tage* alten Zellkultur (39. und 40. Passage) liegt bei ca. 8% nach einer dreistündigen Inkubation und bei ca. 12% nach einer fünfstündigen Inkubation (Tab. 4.2, S. 64).

Tab. 4.2: Übersicht zu den Ergebnissen der Salmonelleninfektion in der Caco-2 Zellkultur

Alter der Zellkultur	Expositionszeit	Anzahl infizierter Zellen %	Anzahl der Salmonellen/Zelle
7 Tage	3 h	$9,7 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
7 Tage	5 h	$7,9 \pm 2,1$	$1,9 \pm 0,2$
14 Tage	3 h	$8,1 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,6$
14 Tage	5 h	$11,5 \pm 1,0$	$2,0 \pm 0,5$

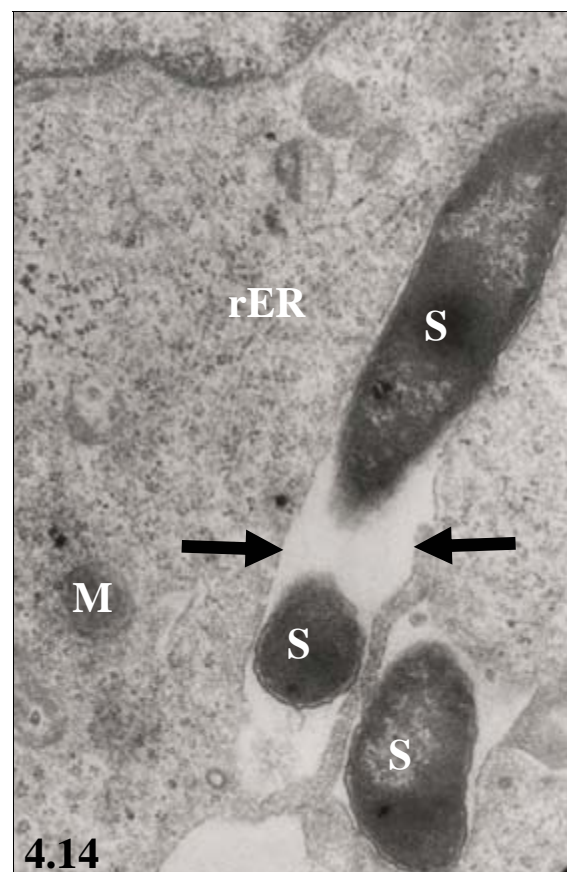
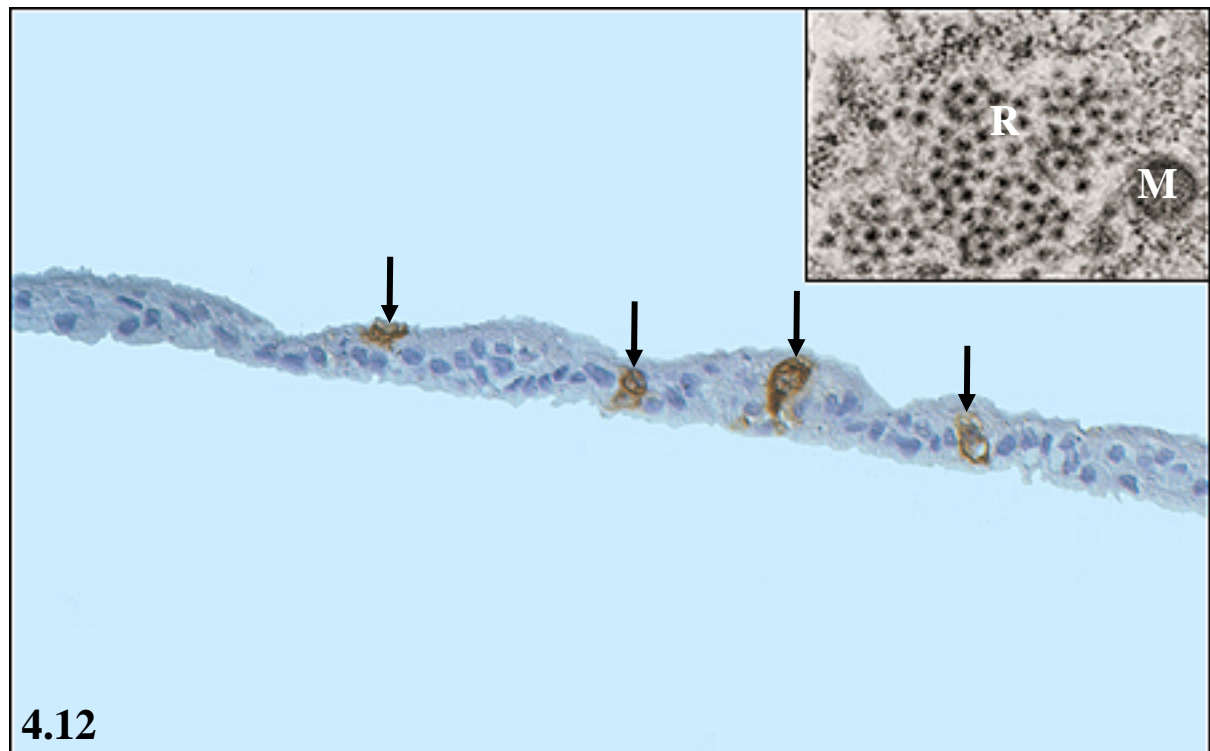
Die auf die Zellkulturen verbrachten Salmonellen liegen entweder frei im Mikrovillisaum (Adhäsion) (Abb. 4.13, S. 66), vereinzelt im Interzellularspalt (Abb. 4.14, S. 66) oder innerhalb von Vakuolen im Zytoplasma (Penetration) (Abb. 4.15, S. 69). In den *sieben Tage* alten Zellkulturen mit dreistündiger Expositionszeit sind die Mikroorganismen innerhalb der Caco-2 Zellen vermehrt im unteren Drittel der Zelle lokalisiert. In seltenen Fällen sind die Erreger in einer Membranpore (Poren der Membran auf der die Zellkultur wächst, ohne Zellbestandteile) (vgl. Abb. 4.1, S. 50) oder in einem sog. Zellausläufer (in eine Membranpore hineinwachsende Zelle, inklusive ihrer Zellorganellen) zu erkennen. Im Anschluss an eine fünfstündige Expositionszeit sowie bei den *14 Tage* alten Zellkulturen liegen die Erreger überwiegend intrazytoplasmatisch im oberen Drittel der Zelle. Bakterien im Mikrovillisaum und im Interzellularspalt sind nur bei den *14 Tage* alten Zellkulturen, unabhängig von der Expositionszeit, erkennbar (Tab. 4.3, S. 67). Nur einmal konnten bei einer *sieben Tage* alten Zellkultur mit einer Inkubationszeit von fünf Stunden zwei mit Salmonellen infizierte Zellen direkt nebeneinander beobachtet werden.

Immunhistologische und transmissionselektronenmikroskopische Befunde an der Caco-2 Zellkultur im Anschluss an eine Infektion mit Rotaviren bzw. mit Salmonellen

Abb. 4.12: Mittels der Immunhistologie kann intrazytoplasmatisch Rotavirus-Antigen (**Pfeile**) in einer 14 Tage alten Zellkultur nach einer 72stündigen Inkubation nachgewiesen werden. Inset: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der Rotaviren (**R**) in einer 14 Tage alten Caco-2 Zelle nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden; (**M**) Mitochondrien (Immunhistologie, Rotavirus-Antikörper, Normarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x; Inset: Transmissionselektronenmikroskopie, Gerätevergrößerung 12000x).

Abb. 4.13: Im Mikrovillisaum einer sieben Tage alten Zellkultur ist im Anschluss an eine dreistündige Inkubationszeit ein Bakterienquerschnitt (**S**), dessen Morphologie zu *Salmonella* spp. passt, erkennbar; (**M**) Mitochondrium; (**Pfeilspitzen**) Mikrovillisaum (TEM, Gerätevergrößerung 30000x).

Abb. 4.14: In einer 14 Tage alten Zellkultur, die für drei Stunden mit *Salmonellen* inkubiert worden ist, sind einige dieser Bakterien (**S**) im Interzellularspalt (**Pfeile**) zu beobachten; (**rER**) raues endoplasmatisches Retikulum; (**M**) Mitochondrien (TEM, Gerätevergrößerung 12000x).



Tab. 4.3: Übersicht über die Lokalisation der Salmonellen in der Caco-2 Zellkultur (gerundete Mittelwerte)

Alter der Zell- kultur	Exposi- tionszeit	Mikro- villi %	Zellaus- läufer %	Oberes Drittel	Mittle- res Drittel	Unte- res Drittel	Pore %	Inter- zellular- spalt %
7 Tage	3 h	---	2	---	---	3	2	---
7 Tage	5 h	---	---	7	6	2	---	---
14 Tage	3 h	---	---	9	1	---	---	3
14 Tage	5 h	3	3	24	2	6	3	6

Legende zu Tab. 4.3: Pore (Membranpore des Mikrowelleinsatzes ohne Zellbestandteile)
Zellausläufer (in eine Pore hineinwachsende Zelle inklusive ihrer Zellorganellen)

Das Zytoplasma der Caco-2 Zellen innerhalb mit Salmonellen inkubierten Zellkulturen ist an einigen Stellen gering- bis mittelgradig aufgelockert, d.h. es treten optisch leere Räume auf, die auch als „cloudy swelling“ (vgl. Kapitel 4.5.2.1, S. 59) bezeichnet werden. Dies betrifft sowohl erregerehaltige (ein oder zwei Salmonellen pro Zelle) als auch nicht erregerehaltige Zellen, wobei, hinsichtlich des Auftretens dieser optisch leeren Räume, weder quantitativ noch qualitativ morphologisch erfassbare Unterschiede zu den untersuchten Kontroll-Zellen auftreten. Diejenigen Zellen, die vier oder mehr Bakterien enthalten, zeigen ein stärker ausgeprägtes „cloudy swelling“ im Bereich des Zytoplasmas; das Zytoskelett und die Zellorganellen weisen keine morphologisch erkennbaren Unterschiede im Vergleich zu den Kontroll-Zellen auf.

Die infizierten Zellen und die Kontrollzellen unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Morphologie, der Quantität und der Position der einzelnen Zellorganellen. Die Anzahl der Zellen mit Sekundärlysosomen in den *sieben* und *14 Tage* alten, mit Salmonellen infizierten Zellen stimmt in etwa mit denen der Kontroll-Zellen überein.

Die Morphologie des Mikrovillisaums, der Zellkerne und der Zellorganellen in den infizierten Zellen entspricht derjenigen der Kontroll-Zellkulturen.

Interzelluläre, mit Mikrovilli ausgekleidete Kanäle treten zwischen ca. 0,9% der Zellen innerhalb der untersuchten und mit Salmonellen infizierten Zellkulturen auf (Kontroll-Zellkultur:

ca. 3,2%), wobei es sich bei den kanalbildenden Zellen nur um solche Zellen handelt, in denen morphologisch keine Salmonellen nachweisbar sind.

Die Mitosefiguren sind in den mit Salmonellen infizierten Zellkulturen ebenso häufig zu finden wie in der Kontroll-Zellkultur.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Salmonellen in geringer Menge extra- und intrazellulär nachweisbar sind, ohne in den betroffenen Zellen relevante, morphologisch erfassbare Veränderungen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen auszulösen.

4.5.3.2 Immunhistologische Befunde

Die intrazytoplasmatisch liegenden Salmonellen können in allen untersuchten Proben (n=6) mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers immunhistologisch nachgewiesen werden. Die Anzahl der positiv reagierenden Zellen (infizierte Zellen) (Abb. 4.16, S. 69) entspricht den bereits aufgeführten transmissionselektronenmikroskopisch dokumentierten Ergebnissen (vgl. Kapitel 4.5.3.1, S. 63).

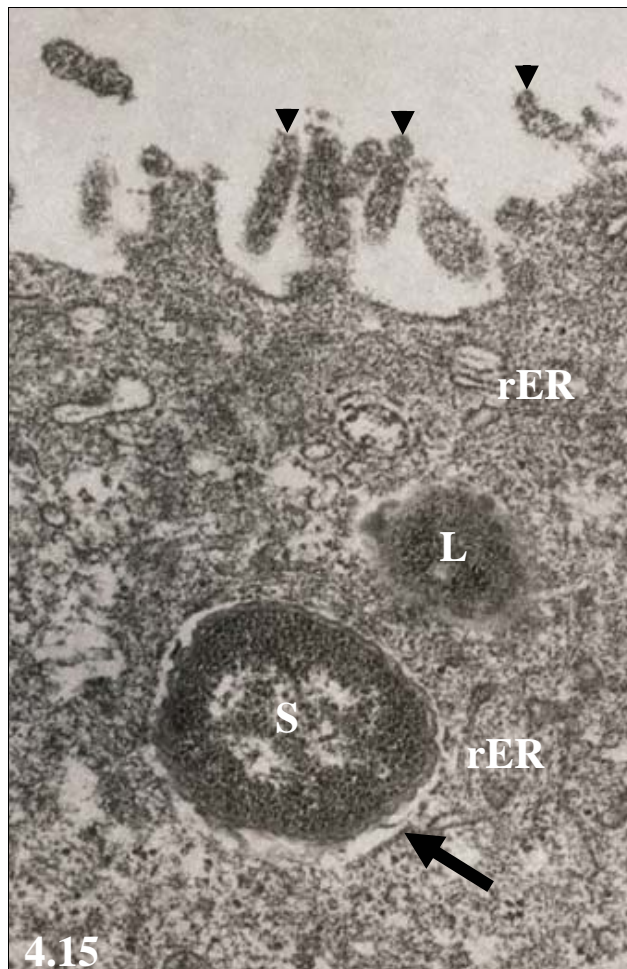
4.5.4 Sekundärinfektion

Eine *sieben Tage* alte Zellkultur (41. Passage) und eine *14 Tage* alte Zellkultur (40. Passage) sind jeweils für 17 bzw. 72 Stunden mit einer Rotaviruskonzentration von $1 \times 10^{5,3}$ KID₅₀/ml inkubiert (Primärinfektion) *und* anschließend zusätzlich für drei bzw. fünf Stunden mit einer Salmonellenkonzentration von 1×10^6 KBE/ml (Sekundärinfektion) inkubiert worden (Abb. 3.4, S. 41 und 3.5, S. 42).

Beurteilung an Ultradünnschnitten

Im Anschluss an die oben beschriebene Sekundärinfektion können Rotaviren *und* Salmonellen (Abb. 4.17, S. 71) sowohl bei den *sieben* als auch bei den *14 Tage* alten Zellkulturen, extra- und intrazellulär lokalisiert, nachgewiesen werden.

Nach der Sekundärinfektion sind keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der Erreger (Rotaviren *und* Salmonellen) im Vergleich zu der jeweiligen Monoinfektion (Rotaviren *oder* Salmonellen) feststellbar. Allerdings kann innerhalb der mit Rotaviren *und* Salmonellen infizierten Zellen sehr vereinzelt das Auftreten beider Erreger zusammen innerhalb einer Caco-2 Zelle beobachtet werden.



Elektronenmikroskopische und immunhistologische Befunde an der Caco-2 Zellkultur im Anschluss an eine Infektion mit Salmonellen

Abb. 4.15: Im Anschluss an eine dreistündige Inkubation der sieben Tage alten Zellkultur mit Salmonellen, ist eine intrazytoplasmatisch liegende, von einer einfachen Membran (**Pfeil**) umgrenzte „Salmonelle“ (**S**) nachweisbar; (**rER**) raues endoplasmatisches Retikulum; (**L**) Lysosomen; (**Pfeilspitzen**) Mikrovillisaum (TEM, Gerätevergrößerung 30000x).

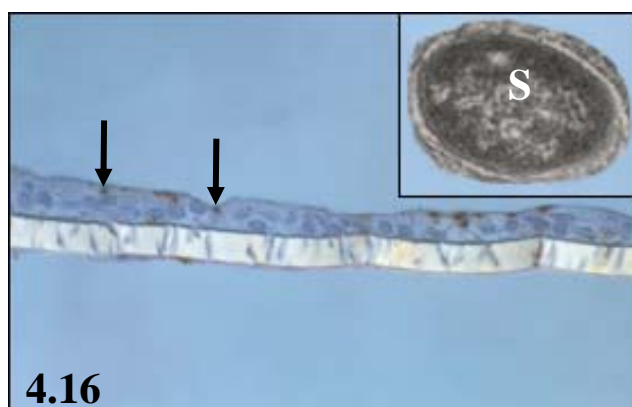


Abb. 4.16: Die intrazytoplasmatisch liegenden Salmonellen (**Pfeile**) in einer 14 Tage alten Zellkultur nach einer fünfstündigen Inkubation lassen sich immunhistologisch nachweisen. Inset: Ausschnitt von Salmonella sp. (**S**) in einer 14 Tage alten Caco-2 Zelle. (Immunhistologie, Salmonellenantikörper, Normarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x; Inset: Transmissionselektronenmikroskopie, Gerätevergrößerung 30000x).

Vergleicht man die **Anzahl der infizierten Zellen** (Gesamtzahl der infizierten Zellen; Anzahl der mit Rotaviren infizierten Zellen; Anzahl der mit Salmonellen infizierten Zellen; Anzahl der Zellen, die Rotaviren *und* Salmonellen enthalten), in Abhängigkeit vom Zellalter (*sieben Tage* und *14 Tage* alte Zellkulturen) und/oder von den unterschiedlichen Expositionszeiten (17 Stunden Rotaviren und drei Stunden Salmonellen; 17 Stunden Rotaviren und fünf Stunden Salmonellen; 72 Stunden Rotaviren und drei Stunden Salmonellen, 72 Stunden Rotaviren und fünf Stunden Salmonellen), mit- sowie untereinander, können zwar geringfügige Unterschiede festgestellt werden, die jedoch **keine Korrelationen** zwischen der Anzahl der infizierten Zellen, deren Zellalter und/oder den Expositionszeiten erkennen lassen (Tab. 4.4, S. 72).

Auch mittels der vergleichenden Gegenüberstellung der **Anzahl der Erreger pro Zelle** (Rotaviren/Zelle; Salmonellen/Zelle; Rotaviren *und* Salmonellen/Zelle) können, in Abhängigkeit vom Zellalter (*sieben Tage* und *14 Tage* alte Zellkulturen) und/oder von den unterschiedlichen Expositionszeiten (17 Stunden Rotaviren und drei Stunden Salmonellen; 17 Stunden Rotaviren und fünf Stunden Salmonellen; 72 Stunden Rotaviren und drei Stunden Salmonellen, 72 Stunden Rotaviren und fünf Stunden Salmonellen), **keine Wechselbeziehungen** zwischen der Erregeranzahl pro Zelle, dem Zellalter und/oder den Expositionszeiten aufgezeigt werden (Tab. 4.4, S. 72).

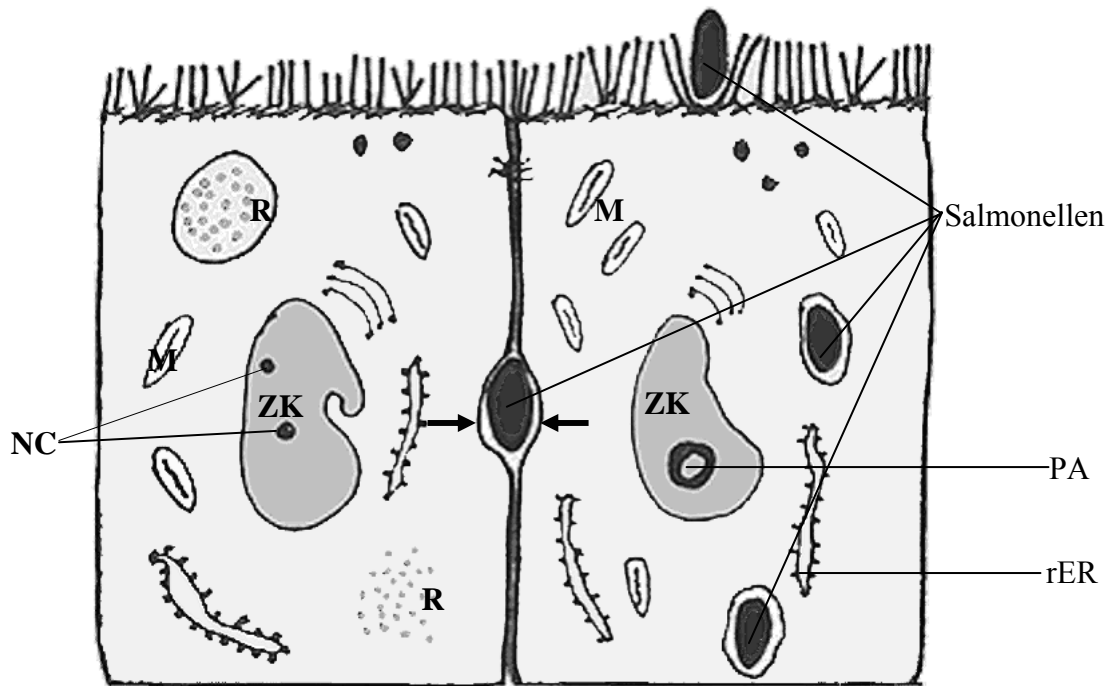


Abb. 4.17: Schematische Darstellung der Lokalisation der Rotaviren und der Salmonellen in der untersuchten Caco-2 Zellkultur: Die Rotaviren (**R**) können innerhalb der infizierten Zellen frei im Zytoplasma oder auch in Vakuolen liegen. Die Salmonellen sind im Mikrovillisaum, intrazytoplasmatisch oder, sehr selten, im Interzellularspalt (**Pfeile**) nachweisbar. Die Zellkerne (**ZK**) einschließlich der Nucleoli (**NC**) und die Zellorganellen (Mitochondrien (**M**), das raue endoplasmatische Retikulum (**rER**)) sind morphologisch nicht verändert. Vereinzelt kann eine vergrößerte Pars amorph (**PA**) der Nucleoli beobachtet werden.

Tab. 4.4: Übersicht der Sekundärinfektion in der Caco-2 Zellkultur

Alter der Zell-Kultur	Exposi- tionszeit	Anzahl infizierter Zellen %				Anzahl der Erreger je Zelle			
		gesamt	Rotav.	Salm.	Rotav. + Salm.	Rotav. /Zelle	Salm./ Zelle	Rotav. + Salm. /Zelle	
7 Tage	17 h R/ 3 h S	7,8±0,2	3,6±0,2	2,1±0,9	2,1±0,5	74±4,9	2,0±0,9	74±11,1 R + 3±0,9 S	
7 Tage	17 h R/ 5 h S	12,5±3,5	5,6±1,1	6,9±2,8	---	113±7,5	2,2±0,2	---	
7 Tage	72 h R/ 3 h S	25,0±1,3	25,0±8,3	---	---	118±5,2	---	---	
7 Tage	72 h R/ 5 h S	6,8±0,9	4,9±2,1	1,9±0,5	---	103±9,5	3,5±1,1	---	
14 Tage	17 h R/ 3 h S	17,6±2,8	13,1±4,2	2,4±1,4	2,1±0,2	510±167,6	0,2±0,06	45±9,0 R + 4,5±1,0 S	
14 Tage	17 h R/ 5 h S	14,3±4,1	2,3±0,6	12,0±3,7	---	83±6,3	2,9±0,5	---	
14 Tage	72 h R/ 3 h S	14,7±2,3	8,1±2,8	5,4±1,3	1,1±0,3	168±7,8	1,8±0,2	41±7,9 R + 3±0,8 S	
14 Tage	72 h R/ 5 h S	20,5±5,1	0,6±0,2	19,9±3,2	---	23,0±3,2	2,0±0,1	---	

Legende zu Tab. 4.4: R/Rotav. Rotaviren S/Salm. Salmonellen

4.5.5 Sekundärinfektion im Vergleich zur Monoinfektion hinsichtlich der Anzahl der infizierten Zellen und der Erreger pro Zelle

Vergleicht man die Ergebnisse der Monoinfektionen mit denen der Sekundärinfektionen (bei jeweils gleichem Zellalter und gleicher Expositionszeit) fällt hinsichtlich der Anzahl der mit Salmonellen infizierten Caco-2 Zellen auf, dass innerhalb der mit Rotaviren *und* Salmonellen inkubierten Zellkulturen weniger erregerhaltige Zellen nachweisbar sind. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zeigt die Tabelle 9.1, S. 130. Im Folgenden werden die Sekundärinfektionen den jeweiligen Monoinfektionen, unter Berücksichtigung der gleichen Bedingungen hinsichtlich des Zellalters und der Expositionszeit, gegenübergestellt.

Gegenüberstellung sieben Tage alter Zellkulturen:

Monoinfektionen (17 Stunden Rotaviren bzw. drei Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (17 Stunden Rotaviren *und* drei Stunden Salmonellen) (Tab. 4.5).

Innerhalb der Zellkultur, die mit Rotaviren *und* Salmonellen inkubiert wurde, sind weniger erregerhaltige Zellen nachweisbar, verglichen mit den jeweiligen Monoinfektionen. Dies betrifft sowohl die mit Rotaviren als auch die mit Salmonellen infizierten Zellen.

Bei der Sekundärinfektion sind, im Vergleich zur Monoinfektion, weniger Rotaviren zu finden, wobei sich diese Verhältnisse hinsichtlich der Salmonellenanzahl je Zelle umgekehrt darstellen.

Das gemeinsame Auftreten von Rotaviren *und* Salmonellen innerhalb einer Zelle kann in 2% der untersuchten Zellen beobachtet werden.

Tab. 4.5: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion sieben Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 17 Stunden und/oder Salmonellen von drei Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

7 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 17 Stunden		
	Salmonellen 3 Stunden		
Mono-Infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	9
		Salmonellen	10
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	103
		Salmonellen	1
Sekundär-infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	4
		Salmonellen	2
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	74
		Salmonellen	2

Gegenüberstellung sieben Tage alter Zellkulturen:

Monoinfektionen (17 Stunden Rotaviren bzw. fünf Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (17 Stunden Rotaviren *und* fünf Stunden Salmonellen) (Tab. 4.6).

Die Anzahl der mit Salmonellen infizierten Zellen und die der Salmonellen pro Zelle bleibt gleich, unabhängig davon, ob es sich um eine Mono- oder eine Sekundärinfektion handelt.

Dies gilt jedoch nicht für die Rotaviren: Bei der Sekundärinfektion sind, im Vergleich zur Monoinfektion, weniger mit Viren infizierte Zellen nachweisbar und innerhalb der mit Rotaviren *und* Salmonellen inkubierten Zellkultur werden mehr Viren pro Zelle im Gegensatz zu der jeweiligen Monoinfektion gefunden.

Tab. 4.6: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion sieben Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 17 Stunden und/oder Salmonellen von fünf Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

7 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 17 Stunden		
	Salmonellen 5 Stunden		
Mono- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	9
		Salmonellen	8
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	103
		Salmonellen	2
Sekundär- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	6
		Salmonellen	7
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	114
		Salmonellen	2

Gegenüberstellung sieben Tage alter Zellkulturen:

Monoinfektionen (72 Stunden Rotaviren bzw. drei Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (72 Stunden Rotaviren *und* drei Stunden Salmonellen) (Tab. 4.7, S. 75).

Innerhalb der Zellkultur, die einer Sekundärinfektion ausgesetzt wurde, sind mehr viruspartikelhaltige Zellen und auch mehr Rotaviren pro Zelle vorhanden als bei der Monoinfektion.

Während bei der Sekundärinfektion keine Salmonellen nachweisbar sind, können in der Zellkultur, die drei Stunden mit Salmonellen inkubiert worden ist, einige erregerehaltige Caco-2 Zellen beobachtet werden.

Tab. 4.7: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion sieben Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 72 Stunden und/oder Salmonellen von drei Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

7 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 72 Stunden		
	Salmonellen 3 Stunden		
Mono- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	6
		Salmonellen	10
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	97
		Salmonellen	1
Sekundär- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	25
		Salmonellen	keine
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	118
		Salmonellen	keine

Gegenüberstellung sieben Tage alter Zellkulturen:

Monoinfektionen (72 Stunden Rotaviren bzw. fünf Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (72 Stunden Rotaviren und fünf Stunden Salmonellen) (Tab. 4.8).

Bei der Sekundärinfektion sind, im Gegensatz zu der Monoinfektion, weniger mit Salmonellen infizierte Zellen zu beobachten. Die Anzahl der mit Rotaviren infizierten Zellen und die Anzahl der Erreger (Rotaviren bzw. Salmonellen) pro Zelle bleiben bei der Sekundärinfektion, im Vergleich mit der jeweiligen Monoinfektion, annähernd gleich.

Tab. 4.8: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion sieben Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 72 Stunden und/oder Salmonellen von fünf Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

7 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 72 Stunden		
	Salmonellen 5 Stunden		
Mono- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	6
		Salmonellen	8
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	97
		Salmonellen	2
Sekundär- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	5
		Salmonellen	2
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	83
		Salmonellen	3

Gegenüberstellung 14 Tage alter Zellkulturen:**Monoinfektionen (17 Stunden Rotaviren bzw. drei Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (17 Stunden Rotaviren *und* drei Stunden Salmonellen)** (Tab. 4.9).

Die Anzahl der mit Rotaviren infizierten Zellen und die Menge der Rotaviren innerhalb einer Zelle verändern sich nicht bei der Sekundärinfektion im Vergleich zu der Monoinfektion.

Im Unterschied dazu können im Rahmen der Sekundärinfektion deutlich weniger mit Salmonellen infizierte Zellen und auch weniger Bakterien pro Zelle im Vergleich zu der Monoinfektion nachgewiesen werden.

Das gemeinsame Auftreten von Rotaviren *und* Salmonellen innerhalb einer Zelle kann in 2% der untersuchten Zellen beobachtet werden.

Tab. 4.9: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion 14 Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 17 Stunden und/oder Salmonellen von drei Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

14 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 17 Stunden		
	Salmonellen 3 Stunden		
Mono- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	10
		Salmonellen	8
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	344
		Salmonellen	2
Sekundär- infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	13
		Salmonellen	2
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	510
		Salmonellen	0,2

Gegenüberstellung 14 Tage alter Zellkulturen:**Monoinfektionen (17 Stunden Rotaviren bzw. fünf Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (17 Stunden Rotaviren *und* fünf Stunden Salmonellen)** (Tab. 4.10, S. 77).

Innerhalb der Zellkultur, die mit Rotaviren *und* Salmonellen inkubiert worden ist, sind deutlich weniger viruspartikelhaltige Zellen und auch weniger Rotaviren pro Zelle vorhanden als bei der Monoinfektion.

Im Gegensatz dazu kann zwischen der Mono- und der Sekundärinfektion, hinsichtlich der Anzahl der mit Salmonellen infizierten Zellen und bezüglich der Menge der Salmonellen je Zelle, keine Änderung festgestellt werden.

Tab. 4.10: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion 14 Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 17 Stunden und/oder Salmonellen von fünf Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

14 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 17 Stunden		
	Salmonellen 5 Stunden		
Mono-Infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	10
		Salmonellen	12
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	344
		Salmonellen	2
Sekundär-infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	2
		Salmonellen	12
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	83
		Salmonellen	3

Gegenüberstellung 14 Tage alter Zellkulturen:

Monoinfektionen (72 Stunden Rotaviren bzw. drei Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (72 Stunden Rotaviren und drei Stunden Salmonellen) (Tab. 4.11, S. 78).

Bei der Sekundärinfektion lassen die Anzahl der mit Rotaviren infizierten Zellen sowie die Anzahl der Salmonellen pro Zelle im Vergleich zu der jeweiligen Monoinfektion keine Änderungen erkennen.

Innerhalb der Zellkultur, die mit Rotaviren und Salmonellen inkubiert worden ist, sind, im Gegensatz zu den jeweiligen Monoinfektionen, weniger bakterienhaltige Zellen und mehr Viruspartikel pro Zelle nachweisbar.

Das gemeinsame Auftreten von Rotaviren und Salmonellen innerhalb einer Zelle kann in 1% der untersuchten Zellen beobachtet werden.

Tab. 4.11: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion 14 Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 72 Stunden und/oder Salmonellen von drei Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

14 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 72 Stunden		
	Salmonellen 3 Stunden		
Mono-Infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	7
		Salmonellen	8
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	140
		Salmonellen	2
Sekundär-infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	8
		Salmonellen	5
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	168
		Salmonellen	2

Gegenüberstellung 14 Tage alter Zellkulturen:

Monoinfektionen (72 Stunden Rotaviren bzw. fünf Stunden Salmonellen) und Sekundärinfektion (72 Stunden Rotaviren und fünf Stunden Salmonellen) (Tab. 4.12).

Bei der Sekundärinfektion sind, im Gegensatz zu der Monoinfektion, weniger mit Rotaviren infizierte Zellen und zudem auch weniger Viruspartikel pro Zelle nachweisbar. Im Unterschied dazu sind im Rahmen der Sekundärinfektion wesentlich mehr salmonellenhaltige Zellen vorhanden als bei der Monoinfektion; die Anzahl der Bakterien pro Zelle ändert sich jedoch nicht.

Tab. 4.12: Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektion 14 Tage alter Caco-2 Zellkulturen bei einer Inkubation mit Rotaviren von 72 Stunden und/oder Salmonellen von fünf Stunden Dauer hinsichtlich des Erregernachweises (gerundete Mittelwerte)

14 Tage alte Zellkultur			
Expositionszeit	Rotaviren 72 Stunden		
	Salmonellen 5 Stunden		
Mono-infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	7
		Salmonellen	12
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	141
		Salmonellen	2
Sekundär-infektion	Anzahl infizierter Zellen %	Rotaviren	1
		Salmonellen	20
	Erreger pro Zelle	Rotaviren	23
		Salmonellen	2

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vergleichende Betrachtung der Sekundärinfektionen mit den jeweiligen Monoinfektionen (Tab 4.5 bis Tab. 4.12, S. 73 bis S. 78), unter Berücksichtigung der gleichen Bedingungen hinsichtlich des Zellalters und der Expositionszeiten, **keine Korrelationen** zwischen der Anzahl der infizierten Zellen, deren Zellalter und/oder den unterschiedlichen Expositionszeiten erkennen lässt und dass **keine Wechselbeziehungen** zwischen der Erregeranzahl pro Zelle, dem Zellalter und/oder den Expositionszeiten bestehen.

4.5.6 Morphologischer Vergleich der infizierten Zellen mit den nicht infizierten Zellen innerhalb einer infizierten Caco-2 Zellkultur

Die Morphologie der infizierten Zellen unterscheidet sich von der der nicht infizierten Zellen in Abhängigkeit von der Erregeranzahl bzw. durch die Ausdehnung der Erreger enthaltenden Vakuolen: Treten 100 oder mehr Rotaviren bzw. drei oder mehr Salmonellen innerhalb großer, intrazytoplasmatisch lokalisierter Vakuolen auf, kann ein ausgeprägtes „cloudy swelling“ im Zytoplasma der betroffenen Zellen beobachtet werden. Während das Zytoplasma der Zelle somit aufgelockert erscheint, sind die Zellorganellen, mit Ausnahme des gering- bis mittelgradig erweiterten endoplasmatischen Retikulums, jedoch unverändert.

Die anderen Zellstrukturen der infizierten Zellen, wie der Mikrovillisaum und der Interzellularspalt, lassen keine Unterschiede im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen erkennen.

5. Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

Während im Rahmen von *in-vivo* Versuchen des Graduiertenkollegs (orale Verabreichung von Endotoxin an Schweine) komplexe pathophysiologische Reaktionen an der „Funktionseinheit Magen-Darm-Trakt“ beurteilt wurden, sollten weiterführend *in-vitro* Systeme zum Studium einzelner Strukturelemente etabliert, evaluiert und eingesetzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe von *in-vitro* Versuchen den Einfluss enteropathogener Erreger sowie deren Toxine auf die Morphologie des Enterozyten –als wesentlichster Bestandteil der intestinalen Barriere– zu untersuchen, um festzustellen, inwieweit eine direkte Zellschädigung durch zytotoxische Effekte auftritt und/oder mediatorvermittelte ätiopathogenetische Vorgänge eine Rolle spielen.

Zu diesem Zweck wurde die Caco-2 Zelllinie als *in-vitro* Enterozytenmodell genutzt, um mögliche Parallelen zu morphologischen Veränderungen am Darm von Schlachtschweinen aufzuzeigen, die im Rahmen experimenteller Versuche des Graduiertenkollegs einer chronischen oralen Endotoxinbelastung (LPS von *Salmonella typhimurium*) ausgesetzt waren.

Von besonderem Interesse ist es, die morphologischen Effekte von:

- *Salmonella typhimurium*-LPS (in verschiedenen Konzentrationen und nach unterschiedlichen Expositionszeiten)
- Rotaviren (als Monoinfektion bei variierenden Expositionszeiten)
- *Salmonella typhimurium* (als Monoinfektion bei variierenden Expositionszeiten)
- Rotaviren (als Primärinfektion) und *Salmonella typhimurium* (als Sekundärinfektion)

auf die Caco-2 Zellkultur darzustellen und mit Hilfe der konventionellen Histopathologie, der Immunhistochemie und der Transmissionselektronenmikroskopie detailliert zu charakterisieren, um die Interaktionen der Erreger mit der Zellkultur zu beurteilen und diese mit denen der Erreger am Darm *in-vivo* zu vergleichen.

5.2 Charakterisierung der verwendeten Caco-2 Zellkultur

Die Caco-2 Zellkultur zeigt morphologisch verschiedene Kennzeichen eines gut differenzierten Kolonkarzinoms, wobei die Zellen überwiegend mit Enterozyten *in-vivo* vergleichbare Charakteristika aufweisen: Die Zellkultur bildet ultrastrukturell einen ein- bis zweischichtigen polarisierten Zellverband mit gut differenzierten Epithelzellen, deren Mikrovillisaum morphologisch annähernd den physiologischen Mikrovilli der Darmepithelzellen entspricht, teilweise

jedoch atypische, „blumenstraußähnliche Büschel“ (vgl. Abb. 4.1, S. 50) bildet. Diese Beobachtungen sind in der Literatur ebenfalls beschrieben (PINTO et al. 1983, BRISKE-ANDERSON et al. 1997). Die annähernd physiologische Ausbildung des Mikrovillisaums an der Caco-2 Zellkultur ist wichtig für den Erstkontakt mit Antigenen, so dass die in dieser Studie zu beobachtenden Anhaftungsvorgänge von Erregern an die Mikrovilli mit den Vorgängen am Enterozytensaum *in-vivo* weitgehend vergleichbar sind. Inwieweit das Fehlen der Schleim sezernierender Becherzellen *in-vitro* einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Epithelzellen und Antigenen besitzt, kann mittels der verwendeten Caco-2 Zellkultur im Rahmen dieser Studie nicht beurteilt werden. Eine von MATTAR et al. (2002) beobachtete sekretorische Tätigkeit der Caco-2 Zellen ist mittels der eigenen transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht nachweisbar.

Der Interzellularspalt ist bei der Caco-2 Zellkultur mit ca. 17 nm lediglich halb so breit wie der Interzellularraum der normalen Enterozyten (ca. 25-35 nm) (FARQUAR u. PALADE 1963, STAEHELIN 1974). Die Interdigitationen (zytoplasmatische Ausstülpungen, vgl. Abb. 4.6, S. 55) der seitlichen Zellmembran, die REVEL (1982) sowie KIRKPATRICK und PFEIFER (1995) bei benachbarten Epithelzellen *in-vivo* beobachtet haben, können mittels eigener Untersuchungen ebenfalls nachgewiesen werden. Der Interzellularspalt spielt *in-vivo* eine große Rolle bei der Erregertranslokation durch die epitheliale Barriere bei der Transport- und Klimabelastung der Schlachtschweine. EHINGER (1998) stellte, bei routinemäßig geschlachteten Schweinen, schon vor der Exenteration, eine gestörte Barrierefunktion des Darmes fest, so dass bei den Tieren, die einer starken Belastung ausgesetzt waren, der Darm „extrem“ durchlässig für Bakterien ist (EHINGER 1998). Der in den eigenen Untersuchungen aufgefallene schmalere Interzellularspalt (im Vergleich zum physiologischen Darmepithel), der auch im Zusammenhang mit den Interdigitationen zu einem sehr engen Kontakt der benachbarten Zelle führt, könnte somit zur Folge haben, dass der parazelluläre Transport zwischen den Epithelzellen erschwert wird. Sobald die Erreger über die *tight junctions* in den engen Interzellularspalt eingedrungen sind, wird die parazelluläre Translokation durch die geringere Anzahl der *Desmosomen* innerhalb der Caco-2 Zellkultur (im Vergleich zum Darmepithel *in-vivo*) aber möglicherweise erleichtert. Inwieweit die Breite des Interzellularspaltes der Caco-2 Zellkultur durch Änderungen der Kulturbedingungen (z.B. veränderte Zusammensetzung des Kulturmediums) beeinflusst werden kann, sollte mittels weiterführender Studien untersucht werden, um Parallelen zu den Bedingungen bei der Schlachttierbelastung *in-vivo* aufzeigen zu können.

Die Zellen der Caco-2 Zellkultur zeigen ein pleomorphes Erscheinungsbild: Ein Drittel der Zellen erscheint isoprismatisch, ein Drittel ist hochprismatisch und ein weiteres Drittel der Zellen bildet eine runde Form aus. Diese mäßig ausgeprägte Pleomorphie hinsichtlich der Epithelzellform beschreibt DAVID (1967) bei seinen Studien am Kolonkarzinom. Im Gegensatz dazu sehen BRISKE-ANDERSON et al. (1997) überwiegend isoprismatische Epithelzellen in der von ihnen untersuchten Caco-2 Zellkultur. Da die Caco-2 Zellkultur eine Kolonkarzinomzelllinie darstellt, wird die geringgradig unterschiedliche Zellmorphologie innerhalb dieser Studie als histologisches Charakteristikum einer Tumorzelllinie angesehen, die trotz alledem aus gut differenzierten Epithelzellen besteht.

Die Zellorganellen der in dieser Studie untersuchten Caco-2 Zellen sind vorwiegend im oberen Drittel der Zellen lokalisiert und entsprechen quantitativ und auch morphologisch weitgehend den Beschreibungen der Zellorganellen von Enterozyten *in-vivo* (MATSUDA et al. 1989). Allerdings weisen die Zellen der Caco-2 Zellkultur, im Gegensatz zu den Darmepithelzellen, eine minimal vermehrte Anzahl von Lysosomen auf. Dies kann im Einklang mit den Ergebnissen von MATSUDA et al. (1989), die mittels ihrer Untersuchungen eine vergleichbare Anzahl von Lysosomen innerhalb der Kolonkarzinomzellen beobachten, als histomorphologisches Kennzeichen von Caco-2 Zellen interpretiert werden.

Die in dieser Studie in der Caco-2 Zellkultur auftretenden pleomorphen Zellkerne, die häufig eingekerbt sind, werden sowohl von DAVID (1967) als auch von MATSUDA et al. (1989) bei Kolonkarzinomen beschrieben. Derartige Zellkerne sind typisch für Zellen mit einer erhöhten metabolischen Aktivität, wie dies z.B. auch in Muskelzellen oder neutrophilen Granulozyten (GHADIALLY 1997) beobachtet werden kann. Daher ist anzunehmen, dass die untersuchten Caco-2 Zellen ebenfalls stoffwechselaktivere Zellen darstellen, wobei dies durch weiterführende funktionelle Untersuchungen verifiziert werden muss.

Eine unkontrollierte Proliferation, aufgrund eines gestörten Gleichgewichtes zwischen Apoptose und Zellteilung, ist unter anderem verantwortlich für die Entstehung eines Kolonkarzinoms (BUTLER et al. 1999). Die vom Kolonkarzinom abstammende und in der vorliegenden Studie genutzte Caco-2 Zellkultur lässt eine mäßig ausgeprägte proliferative Aktivität erkennen, was immunhistologisch durch die gering- bis mittelgradige Expression der Proliferationsmarker Ki-67 Antigen und PCNA, über deren Anwendung an der Caco-2 Zellkultur bisher keine Beschreibungen in der Literatur existieren, dargestellt werden konnte. Apoptotic bodies sind ultrastrukturell nicht erkennbar, mit Hilfe der TUNEL-Technik konnten jedoch vereinzelt apoptotische Zellen nachgewiesen werden.

BRISKE-ANDERSON et al. (1997) beschreiben bei ihrer Untersuchung an der Caco-2 Zellkultur das Auftreten multizellulärer Erhabenheiten von bis zu 20 Zellen mit interzellulär lokalisierten Kanälen, die mit einem Mikrovillisaum ausgekleidet sind. Diese Zellanhäufungen treten erstmals zwischen dem neunten und 15. Tag auf (BRISKE-ANDERSON et al. 1997). In den eigenen Untersuchungen sind zwar einige, mit einem Mikrovillisaum ausgekleidete, Kanäle zu beobachten, aber auch in den 14 Tage alten Zellkulturen sind keine multizellulären Erhabenheiten erkennbar. Die starke Zellproliferation, die von BRISKE-ANDERSON et al. (1997) beobachtet wurde, muss also noch von anderen Einflussfaktoren, außer Zellalter, Kulturmedium und/oder Inkubationstemperatur, abhängig sein. Ein auf die ungehinderte Zellproliferation positiv wirkender Faktor könnte das von den oben genannten Autoren verwendete Antibiotikum Gentamycin darstellen, welches die Zellkultur vor einer unerwünschten Vermehrung von Bakterien schützen sollte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die im Rahmen dieser Studie untersuchte Caco-2 Zellkultur, wie auch von PINTO et al. (1983), CHANTRET et al. (1988), RILEY et al. (1991) beschrieben, überwiegend morphologische Charakteristika eines normalen Darmepithels *in-vivo* besitzt. Hieraus lässt sich, zumindest morphologisch, die Eignung der Caco-2 Zellkultur für die durchgeführten Versuche (LPS- und Infektionsversuche) und die Erfassung der Translokationsvorgänge an einer epithelialen Barriere ableiten.

5.3 Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Inkubation mit LPS im Vergleich zu Enterozyten *in-vivo*

Die Applikation von LPS von *Salmonella typhimurium* auf die Caco-2 Zellkultur führt weder zu lichtmikroskopisch noch zu ultrastrukturell erkennbaren Zellalterationen, unabhängig von den verwendeten Konzentrationen und von den variierenden Expositionszeiten. Sogar eine Expositionszeit von bis zu 26 Stunden führte nicht zu morphologisch erfassbaren Effekten. Dieses Ergebnis erzielten WELLS et al. (1993) ebenfalls im Anschluss an eine 16stündige Inkubation mit dem LPS von *E. coli*. Ebenso sind innerhalb der mit LPS inkubierten Zellkulturen der eigenen Studie mit Hilfe der immunhistologischen Marker Ki-67 Antigen und PCNA, im Vergleich zu den Kontroll-Zellkulturen, keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsaktivität erkennbar.

Die in den eigenen Untersuchungen festgestellte unveränderte Zellmorphologie der mit LPS von *Salmonella typhimurium* inkubierten Caco-2 Zellen (vgl. Abb. 5.1, S. 84) wird auch von ANNE BODENTHIN (Leipzig, 25.03.2003) an Enterozyten von Schlachtschweinen beobach-

tet, die einem 14-tägigen Fütterungsversuch (mit LPS von *Salmonella typhimurium*) ausgesetzt waren. Daher ist anzunehmen, dass die im Rahmen dieser Studie vorherrschenden Kulturbedingungen ein Milieu für die Caco-2 Zellen schaffen, das mit dem des Darmes vergleichbar ist. ANNE BODENTHIN (Leipzig, 25.03.2003) weist jedoch mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen eine Infiltration mit Makrophagen innerhalb des Darmepithels nach. RIETSCHEL et al. (1993b) beschreiben eine Wechselwirkung von Endotoxinen mit zirkulierenden oder gewebsständigen Makrophagen, die nach Freisetzung verschiedener Mediatoren (u.a. TNF α , Interleukine, Prostaglandine) systemische pathophysiologische Reaktionen (z.B. Fieber, Blutdruckabfall, Verbrauchskoagulopathie) bei Mensch und Tier induzieren. Diese komplexen Interaktionen sind jedoch nicht auf die Zellkultur übertragbar, da der Fokus der Untersuchungen hier lediglich auf eine Zellpopulation (den Enterozyten) ausgerichtet ist.

Enterozyten, *in-vivo*

Caco-2 Zellen, *in-vitro*

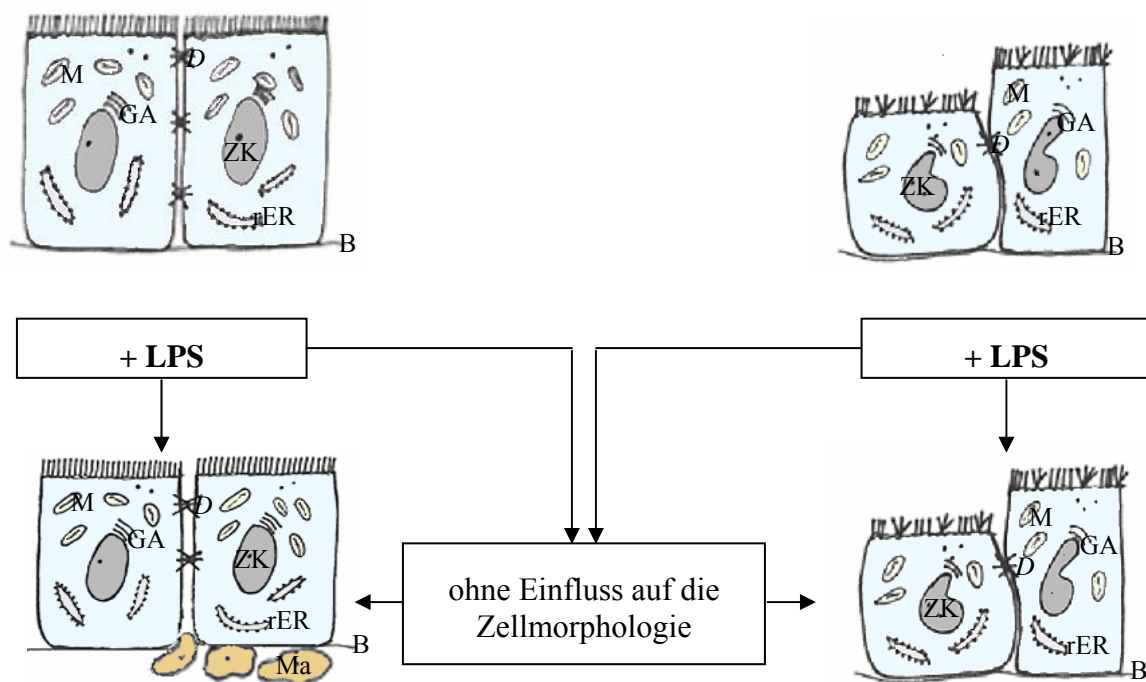


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Caco-2 Zellkultur *in-vitro* vor und nach der Inkubation mit LPS im Vergleich zu Enterozyten *in-vivo*, unabhängig von den unterschiedlichen Konzentrationen und der variierenden Expositionszeit.

Legende: ZK Zellkern
D Desmosomen
M Mitochondrien
GA Golgi-Apparat
rER raues endoplasmatisches Retikulum
B Basalmembran
Ma Makrophagen

Vergleicht man die Ergebnisse der *in-vivo* Versuche (ANNE, BODENTHIN, Leipzig, 25.03.2003) mit denen, die in dieser Studie *in-vitro* erzielt werden konnten, lassen sich Parallelen aufzeigen: Oral verabreichtes Endotoxin scheint an den *in-vivo* untersuchten Enterozyten wie auch an den Caco-2 Zellen zu keinen morphologisch erfassbaren Veränderungen zu führen. Mediatorvermittelte pathophysiologische Reaktionen, die Endotoxine im Organismus, z.B. durch die Wechselwirkung mit Makrophagen, auslösen, können bei dem eigenen Versuchsansatz mit Hilfe der Caco-2 Zellkultur erwartungsgemäß nicht erfasst werden.

5.4 Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Infektion mit Rotaviren im Vergleich zu Enterozyten *in-vivo*

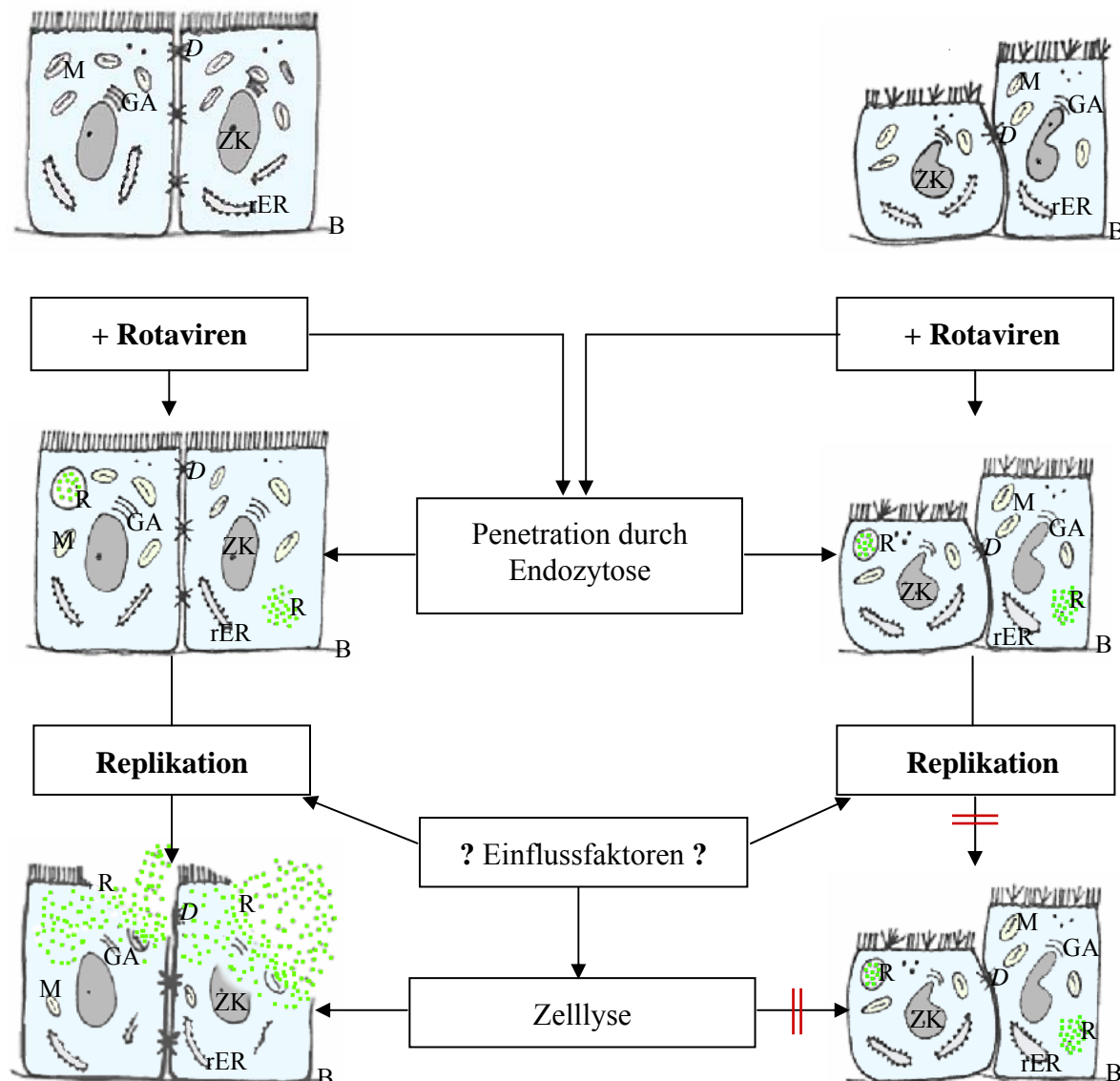
Im Anschluss an eine 17- bzw. 72stündige Inkubation der sieben und 14 Tage alten Caco-2 Zellkulturen mit Rotaviren lässt sich in dieser Studie mittels der Immunhistologie intrazytoplasmatisch Rotavirus-Antigen nachweisen. Transmissionselektronenmikroskopisch sind die Rotaviren intrazellulär in unterschiedlicher Anzahl frei im Zytoplasma oder in Vakuolen liegend erkennbar.

Die meisten unbehüllten Viren scheinen *in toto* durch eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle zu gelangen und liegen anschließend in Vakuolen eingeschlossen im Zytoplasma. Die Viren verlassen diese Vakuolen relativ schnell und sind somit frei intrazytoplasmatisch lokalisiert (BÜTTNER 2002). Der Autor vermutet, dass die Viren damit einer intravakuolären Verdauung zu entgehen versuchen.

Mittels der eigenen Untersuchungen können im Anschluss an eine Inkubation der Caco-2 Kultur mit Rotaviren viruspartikelhaltige Epithelzellen in variierender Anzahl nachgewiesen werden. Eindeutige Kennzeichen für eine Zellschädigung (Karyopyknose, -rhexis, lysis und/oder auch eine Desintegration der Zellmembran bzw. der Zellorganellen), die auf das Vorhandensein der Rotaviren zurückgeführt werden könnte, werden mittels der Transmissionselektronenmikroskopie in den untersuchten Lokalisationen nicht nachgewiesen (Abb. 5.2, S. 86). Die Morphologie der infizierten Zellen entspricht der von den Kontroll-Zellen.

Enterozyten, *in-vivo*

Caco-2 Zellen, *in-vitro*



zum Absterben der Zelle führt (BÜTTNER 2002). Da innerhalb dieser Studie jedoch keine morphologisch erfassbaren Veränderungen an den mit Rotaviren beimpften Caco-2 Zellen festgestellt wurden, ist eine Virusreplikation nicht eindeutig nachweisbar. Darüber hinaus sind im Anschluss an die 72stündige Expositionszeit weniger infizierte Zellen erkennbar und die Erregeranzahl je Zelle ist annähernd gleich oder es werden weniger Rotaviren pro Zelle im Vergleich zu der 17stündigen Inkubationszeit beobachtet. Das Maximum der zellulären Virussynthese (reife Viren) beträgt bei den Rotaviren 20 Stunden p.i. (BÜTTNER 2002). Demzufolge wäre im Anschluss an eine 72stündige Inkubation mit Rotaviren eine drastische Zunahme der Viren pro Zelle zu erwarten gewesen (100 bis 1000 infektiöse Nachkommen in Relation zu der Ausgangsdosis) (BÜTTNER 2002). Mittels der eigenen Untersuchungen konnten jedoch nur 74 bis 510 Viren innerhalb einer Zelle gefunden werden.

Eine Ursache für die geringe Anzahl von Rotaviren innerhalb der untersuchten Epithelzellen der Caco-2 Zellkulturen könnte darin bestehen, dass unreife Viren über das ausgedehnte endoplasmatische Retikulum ausgeschleust werden, wie ebenfalls SVENNISON et al. (1991) und JOURDAN et al. (1997) vermuten. Da auch in den eigenen Untersuchungen ein gering- bis mittelgradig erweitertes endoplasmatisches Retikulum sowie weniger infizierte Zellen und gleich bleibend oder weniger Viren je Zelle nach einer 72stündigen Inkubation auffallen, kann dies in Übereinstimmung mit den hier aufgeführten Autoren als Hinweis für eine Virusausschleusung angesehen werden. Es konnten jedoch keine Viruspartikel innerhalb des endoplasmatischen Retikulums in den ausgewerteten Lokalisationen beobachtet werden. Um diese Vermutung trotzdem zu verifizieren, müsste zusätzlich das Zellkulturmedium der mit Rotaviren infizierten Caco-2 Zellkulturen untersucht werden, um nachzuweisen, ob die Anzahl der intrazellulären Viren und die Menge der Viren in dem Medium im Vergleich zu der Ausgangskonzentration gleich bleiben.

DICKMAN et al. (2000) und OBERT et al. (2000) beobachten im Anschluss an eine Infektion der Caco-2 Zellkultur mit dem „Rhesus Rotavirus“ eine Destruktion der *tight junctions*. Dies stellen die Autoren anhand einer erhöhten parazellulären Diffusion und dem Verlust des transepithelialen elektrischen Widerstandes fest. In der eigenen Studie sind morphologisch keine Veränderungen an den *tight junctions* sichtbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es möglicherweise zu einer funktionellen Störung kommt, die jedoch ohne morphologisch erfassbares Korrelat bleibt. Inwieweit es in diesem Zusammenhang in der vorliegenden Studie zu einem Verlust des transepithelialen elektrischen Widerstandes gekommen ist,

kann allein aus ultrastruktureller Sicht nicht beurteilt werden. Hierfür sollten weiterführende funktionelle Untersuchungen an der Caco-2 Zellkultur erfolgen.

Vergleicht man weiterhin die Resultate der *in-vitro* Versuche aus der vorliegenden Studie mit den in der Literatur (PAUL u. STEVENSON 1992) beschriebenen Befunden am Dünndarm *in-vivo*, fällt auf, dass, im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, Rotaviren *in-vivo* zu schwerwiegenden Veränderungen im Darmepithel führen (PAUL u. STEVENSON 1992): 12 bis 72 Stunden p.i. verursacht die Replikation der Rotaviren im Darmepithel des Dünndarmes *in-vivo* eine Dysfunktion der Zellen, eine Zottenatrophie und den Zelltod (PAUL u. STEVENSON 1992). Es lassen sich Zell-, Mitochondrien- und Kernschwellungen erkennen. Bei jungen Tieren sind die Veränderungen besonders stark ausgeprägt (PAUL u. STEVENSON 1992).

Die Einflussfaktoren, die *in-vivo* eine Virusreplikation ermöglichen, können im Rahmen dieser Studie nicht näher charakterisiert werden. Generell ist die Anzüchtung von Rotaviren schwierig und gelingt in der Regel nur nach Adaptation an Zellkulturen (LIEBERMANN 1992). Dies sollte im Rahmen weiterführender Untersuchungen erfolgen, um mögliche Parallelen zwischen *in-vitro* Modellen und *in-vivo* Befunden, hinsichtlich morphologisch erfassbarer Zellveränderungen infolge einer Virusreplikation, aufzeigen zu können.

5.5 Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Infektion mit Salmonellen im Vergleich zu Enterozyten *in-vivo*

Im Anschluss an eine dreistündige bzw. fünfstündige Inkubation mit *Salmonella typhimurium* der in dieser Studie verwendeten sieben und 14 Tage alten Caco-2 Zellkulturen sind im Mikrovillisaum der Epithelzellen und intrazytoplasmatisch in Vakuolen liegende Salmonellen nachweisbar.

Die Bakterien sind überwiegend im unteren Drittel, im Zytoplasma der morphologisch unveränderten Zelle lokalisiert. TAKEUCHI (1967), REED et al. (1986) und WELLS et al. (1993) beobachten gleichfalls keine morphologischen Veränderungen an mit *Salmonella typhimurium* infizierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Caco-2 Zellen. FINLAY und FALKOW (1990) messen nach einer Expositionszeit von zwei bis drei Stunden mit Salmonellen an Caco-2 Zellen einen sinkenden transepithelialen elektrischen Widerstand. Diese Resultate legen dar, dass an infizierten Caco-2 Zellen möglicherweise funktionelle Störungen auftreten, die jedoch, wie mittels der eigenen ultrastrukturellen Untersuchungsergebnisse gezeigt werden kann, morphologisch nicht erfassbar sind.

Die Anzahl der infizierten Zellen in der vorliegenden Studie liegt nach einer Expositionszeit von drei Stunden unter 10% und es befindet sich meist nur ein Bakterium in einer infizierten Zelle. Im Anschluss an die verlängerte Expositionszeit (fünf Stunden) können hinsichtlich der infizierten Zellen und/oder bezüglich der Erregeranzahl pro Zelle keine wesentlichen Unterschiede aufgezeigt werden. Eine Ursache für die geringe Bakterienanzahl innerhalb der Epithelzellen könnte die von FINLAY und FALKOW (1990) beschriebene bakterielle Translokation durch die Zelle in das „basale“ Zellkulturmedium darstellen. Aus diesem Grund sollte in weiteren Untersuchungen zusätzlich zu der morphologischen Beurteilung der Zelle, wie sie in der eigenen Studie durchgeführt wurde, auch das „basale“ Zellkulturmedium auf das Vorhandensein von translozierten Bakterien untersucht werden.

FOOTE und HOOK (1979) beobachteten *in-vivo*, dass sich Salmonellen, an den Enterozyten haftend, rasch vermehren und anschließend mittels Endozytose in die Epithelzellen eindringen, ohne zu morphologisch erkennbaren Zellschädigungen zu führen und intrazytoplasmatisch, in einer Vakuole eingeschlossen, lokalisiert sind (DEDIE 1993).

Auch mittels der eigenen ultrastrukturellen Untersuchungen können die Salmonellen innerhalb des Mikrovillisaums sowie intravakuolär im Zytoplasma der morphologisch unveränderten Caco-2 Zellen (Abb. 5.3, S. 91) beobachtet werden, wobei die morphologisch nachweisbare Erregeranzahl innerhalb der infizierten Caco-2 Zellkulturen so gering ist, dass nicht von einer Vermehrung der Bakterien ausgegangen wird.

Diese Resultate zeigen, dass die beschriebenen Interaktionen zwischen Salmonellen und den Caco-2 Zellen innerhalb dieser Studie, bzw. zwischen den Bakterien und den Enterozyten *in-vivo* (DEDIE et al. 1993) zu keiner morphologisch erfassbaren Schädigung der betroffenen Zellen führt, und dass die hier verwendete Caco-2 Zellkultur ein geeignetes Modell zum Studium „reiner“ Penetrationsmechanismen von *Salmonella typhimurium*, im Vergleich zum normalen Darmepithel, darstellt.

Mittels der eigenen Untersuchungen können weiterhin bereits nach einer drei- bis fünfstündigen Inkubation Erreger innerhalb der Membranporen (vgl. Abb. 4.1, S. 50) nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von FINLAY und FALKOW (1990) überein, die *in-vitro* eine Translokation der Salmonellen durch die Caco-2 Zellen, ohne morphologisch erfassbare Zellschädigung, sehen.

Auch DEDIE et al. (1993) beschreiben eine Wanderung der Salmonellen durch Enterozyten *in-vivo* ohne nachweisbare Läsionen.

Da jedoch in der vorliegenden Studie keine morphologisch erfassbare Vermehrung der Sal-

monellen im Bereich des Mikrovillisaums beobachtet werden konnte, scheinen im Darmtrakt *in-vivo* weitere Einflussfaktoren (z.B. Bakterienflora, Kohlenhydrate, Mediatoren) bei der bakteriellen Vermehrung eine Rolle zu spielen, die mittels der hier verwendeten Zellkultur nicht imitierbar sind und zum jetzigen Zeitpunkt nicht näher charakterisiert werden können. Eine Ursache, die eine Salmonellenvermehrung hemmt, könnte das zur Subkultivierung der Caco-2 Zellkultur verwendete Trypsin sein, das aus methodischen Gründen nicht vollständig aus der dabei erhaltenen Zellsuspension entfernt werden kann.

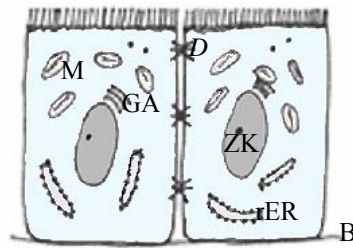
Nach Durchwanderung der Enterozyten *in-vivo* oder über die Peyerschen Plaques dringen die Salmonellen in den subepithelialen Bereich ein und führen zur Leukozytenansammlung und zur Entzündung in der Mukosa (GIANELLA 1979, JIWA 1981). Die nachfolgende Flüssigkeitsausscheidung in das Darmlumen (Diarrhoe) erfolgt durch aktive Sekretion, hervorgerufen z.B. durch Prostaglandine (GIANELLA 1979, JIWA 1981). Von der Mukosa aus können Bakterien, als fakultativ intrazelluläre Erreger, in den Makrophagen überleben, diese als Transportmittel benutzen, weiter zu den Lymphknoten, der Leber und der Milz gelangen und eine systemische Erkrankung bei Mensch und Tier auslösen (TAKEUCHI 1967, SCHRÖDER 2002).

Da innerhalb der hier verwendeten Zellkultur Einflussfaktoren, wie z.B. Prostaglandine und/oder Makrophagen fehlen, sind hinsichtlich deren Rolle bei der Salmonelleninfektion in dieser Studie und somit vergleichsweise bei der Schlachttierbelastung keine Aussagen möglich.

Mittels der eigenen Untersuchungen kann aufgezeigt werden, dass einige Salmonellen in den 14 Tage alten Zellkulturen zusätzlich im Interzellularspalt zu beobachten sind, ohne dass der enge Interzellularspalt morphologisch erkennbare Schädigungen aufweist. Diese Ergebnisse zeigen, dass Salmonellen nicht nur transzellulär sondern auch interzellulär in subepitheliale Bereiche gelangen können, wo letztlich erregerbedingte pathophysiologische Reaktionen ausgelöst werden.

Somit scheint neben der transepithelialen auch eine parazelluläre Translokation von Salmonellen eine Rolle zu spielen. Anhand dieser Erkenntnisse können Erweiterungen des Interzellularspaltes, wie dies von EHINGER (1998) bei klima- und transportbelasteten Schlachtschweinen beobachtet wurde, von wesentlicher Bedeutung für die Folgen einer Schlachttierkörperbelastung sein, sofern den Bakterien über den möglicherweise durch Vorschädigung erweiterten Interzellularspalt ein „leichteres/vermehrtes Eindringen“ in subepitheliale Bereiche gelingt.

Enterozyten, *in-vivo*



Caco-2 Zellen, *in-vitro*

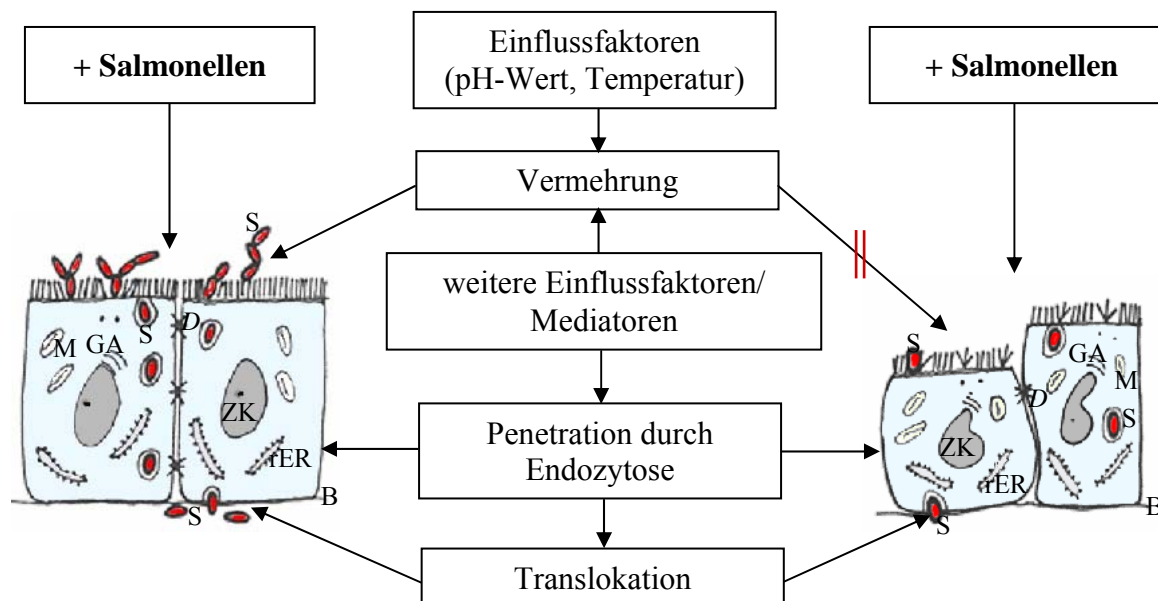
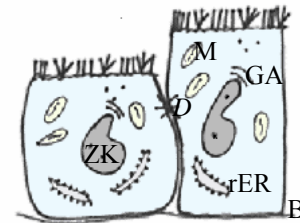


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Caco-2 Zellkultur *in-vitro* vor und nach der Inkubation mit Salmonellen im Vergleich zu Enterozyten *in-vivo* nach Antigenkontakt. Im Anschluss an die Inkubation mit Salmonellen kommt es zur Penetration durch Endozytose mit nachfolgender Translokation durch Epithelzellen *in-vivo* und *in-vitro*. *In-vivo* vermehren sich die Salmonellen an den Enterozyten haftend.

Legende: ZK Zellkern
D Desmosomen
M Mitochondrien
GA Golgi-Apparat

rER raues endoplasmatisches Retikulum
B Basalmembran
S Salmonellen

5.6 Morphologische und immunhistologische Betrachtungen der Caco-2 Zellkultur bei einer Infektion mit Rotaviren und mit Salmonellen im Vergleich zu Enterozyten *in-vivo*

Die unterschiedlichen Expositionszeiten (Sekundärinfektion: 17 Stunden oder 72 Stunden Rotaviren **und** drei Stunden oder fünf Stunden Salmonellen), denen die in dieser Studie verwendeten sieben und 14 Tage alten Zellkulturen ausgesetzt waren, entsprechen den jeweiligen Monoinfektionen (17/72 Stunden Rotaviren **oder** drei/fünf Stunden Salmonellen), so dass die Anzahl der infizierten Zellen und die Menge der Erreger pro Zelle zwischen Sekundärinfektion und jeweiliger Monoinfektion vergleichbar sind.

Im Anschluss an eine Infektion mit Rotaviren erfolgte nach 17 bzw. 72 Stunden zusätzlich eine Inkubation der Caco-2 Zellen mit Salmonellen (für drei bzw. fünf Stunden), wobei in den unterschiedlich alten Zellkulturen (sieben/14 Tage alt) Rotaviren und Salmonellen nachgewiesen werden. Die meisten Zellen sind entweder durch Salmonellen **oder** durch Rotaviren infiziert worden. Nur innerhalb weniger Caco-2 Zellen sind Rotaviren **und** Salmonellen gemeinsam nachweisbar. Ein Zusammenhang zwischen Zellalter, Expositionszeit und/oder intraepithelialer Erregeranzahl kann nicht festgestellt werden.

Die Gesamtanzahl der infizierten Zellen der Sekundärinfektionen (mit Rotaviren und/oder Salmonellen) stimmt in etwa mit der Gesamtanzahl der infizierten Zellen der Monoinfektionen (Rotaviren oder Salmonellen) überein.

Die Anzahl der mit Salmonellen infizierten Zellen bei der Monoinfektionen ($9,3 \pm 1,3$ %) ist annähernd vergleichbar mit der Anzahl der mit Salmonellen infizierten Zellen bei der Sekundärinfektionen ($6,3 \pm 5$ %). Mehrere Studien (BUKHOLM 1988, KONKEL u. JOENS 1990, MODALSLI et al. 1995) zeigen, im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, dass eine Primärinfektion mit Rotaviren oder Coxsackie B 1 Virus das Eindringen von enteropathogenen Bakterien (*Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Shigella flexneri* oder *Yersinia* spp.) in eine embryonale Rhesusaffennierenzelllinie (MA-104) oder in eine Caco-2 Zellkultur fördert. Bei Ferkeln und Kälbern wird beschrieben, dass bei einem durch Rotaviren erkrankten Tier, bei einer Sekundärinfektion mittels *E. coli* (TZIPORI et al. 1980, LECCE et al. 1982, SNODGRASS et al. 1982), deutlichere Krankheitssymptome auftreten. Die Diskrepanz zwischen den eigenen Ergebnissen und den in der Literatur aufgeführten Resultaten *in-vitro* (BUKHOLM 1988, KONKEL u. JOENS 1990, MODALSLI et al. 1995) und *in-vivo* (TZIPORI et al. 1980,

LECCE et al. 1982, SNODGRASS et al. 1982) ist möglicherweise auf die bereits im Kapitel 5.4, S. 85 eingegangene, fehlende Virusreplikation in den untersuchten Caco-2 Zellen zurückzuführen. Da im Rahmen der Monoinfektionen mit Rotaviren der in dieser Studie verwendeten Caco-2 Zellkulturen weder eine Replikation der Erreger noch morphologisch erfassbare Zellschädigungen aufgezeigt werden konnten (vgl. Abb. 5.4, S. 94), sind bei den Sekundärinfektionen der Caco-2 Zellen mit Salmonellen für deren transepitheliale Durchwanderung keine günstigeren Bedingungen vorhanden, die eine Translokation der Bakterien in die subepithelialen Bereiche erleichtern könnten (z.B. durch Zelllyse infolge Virusreplikation).

Darüber hinaus können in der eigenen Studie innerhalb der unveränderten Epithelzellen keine relevanten Änderungen hinsichtlich der Anzahl der Erreger je Zellen zwischen den Sekundärinfektionen (Rotaviren **und** Salmonellen) und den jeweiligen Monoinfektionen (Rotaviren **oder** Salmonellen) festgestellt werden.

Um für eine Sekundärinfektion günstigere Bedingungen zu schaffen, sollte mittels weiterführender Untersuchungen zunächst eine Adaptation der Rotaviren an die Caco-2 Zellkultur erfolgen. Sobald eine nachweisbare Virusreplikation in den Caco-2 Zellen stattfindet, könnte es, wie bei *in-vivo* Untersuchungen beschrieben (BÜTTNER 2002), zur Unterdrückung normaler zelleigener Funktionen mit nachfolgendem Absterben der betroffenen Zellen kommen, was dann einen transepithelialen Salmonelleneintritt durch die entstandenen Epithelzelllücken (infolge Zelllyse) erleichtert. Weiterhin müsste, wie bereits in Kapitel 5.2, S. 80 vorgeschlagen, eine Variation der Zusammensetzung des Kulturmediums erfolgen, um möglicherweise auch die Bakterienvermehrung zu fördern.

Im Anschluss an die jeweiligen Monoinfektionen und auch im Rahmen der Sekundärinfektionen ist in der vorliegenden Studie die Anzahl der mit Rotaviren und Salmonellen infizierten Zellen relativ gering, was erklären würde, warum nur innerhalb einzelner Caco-2 Zellen Rotaviren und Salmonellen zusammen auftreten. Es sollte zusätzlich zu den oben aufgeführten einflussnehmenden Faktoren eine Inkubation der Zellkultur mit einer höheren Erregerkonzentration stattfinden. Die neuen Untersuchungsansätze sind von wesentlicher Bedeutung, um evtl. Vergleiche und/oder Rückschlüsse auf die pathophysiologischen Reaktionen innerhalb eines mit Rotaviren und Salmonellen infizierten Darmepithels *in-vivo* ziehen zu können.

5.7 Abschließende Betrachtung

Die immunhistologischen und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen an der Caco-2 Zellkultur, die ultrastrukturell morphologisch überwiegend vergleichbare Charakteristika von Enterozyten *in-vivo* aufweist und die mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, Rotaviren und/oder Salmonellen mit variierender Expositionszeit, jeweils unter gleichen Kulturbedingungen, inkubiert wurde, zeigen, dass die Caco-2 Zellkultur ein geeignetes Modell zum Studium „reiner“ Penetrationsmechanismen von Rotaviren und Salmonellen sowie für Translokationsvorgänge von *Salmonella typhimurium* an epithelialen Membranen, im Vergleich zum normalen Darmepithel, darstellt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der bisherigen Untersuchungen, insbesondere durch Anwendung der aufgeführten Kulturbedingungen, an den Caco-2 Zellen keine morphologisch erfassbare Zellschädigung als Folge einer direkten Zytotoxizität, bedingt durch die eingesetzten Erreger und deren Toxine, nachgewiesen werden kann. Inwieweit diese Erkenntnisse den pathophysiologischen Reaktionen *in-vivo* entsprechen oder ob die im Zusammenhang mit der Erreger-/Toxinwirkung auftretenden Vorgänge im Wesentlichen mediatorvermittelt sind, bleibt unklar. Aus diesem Grund muss für weitere Untersuchungen eine Adaptation von Rotaviren an die Caco-2 Zellkultur erfolgen, um die Vergleichbarkeit zwischen *in-vitro* Modellen und *in-vivo* Befunden, hinsichtlich morphologisch erfassbarer Zellveränderungen infolge einer Virusreplikation, zu verbessern.

Zudem sollte die Caco-2 Zellkultur „Stressfaktoren“, wie beispielsweise einer veränderten Zusammensetzung des Kulturmediums und/oder einer Inkubation mit höheren Erregerkonzentrationen, ausgesetzt werden, um somit möglicherweise vergleichbare Ergebnisse zu den Befunden eines mit Rotaviren und/oder Salmonellen infizierten Darmepithels *in-vivo* zu erhalten.

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Caco-2 Zellkultur grundsätzlich als Modellsystem zur Translokation von Antigenen durch epitheliale Barrieren unter verschiedenen Bedingungen geeignet ist. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Problematik Schlachttierbelastung und Produktsicherheit mittels eines nach diesen Erfahrungen modifizierten Versuchsansatzes.

6. Zusammenfassung

Michaela Möhring

Die Caco-2 Zellkultur, ein geeignetes *in-vitro* System zum Studium antigen-abhängiger Effekte auf Enterozyten?

Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2003

(120 Seiten, 33 Abbildungen, 17 Tabellen, 241 Literaturangaben, 10 Seiten Anhang)

Schlüsselwörter: Caco-2 Zellkultur, Salmonellen-LPS, Rotaviren, Salmonellen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Caco-2 Zelllinie als *in-vitro* Enterozytenmodell zu nutzen, um mögliche Parallelen zu morphologischen Veränderungen am Darm von Schlachtschweinen aufzuzeigen, die im Rahmen experimenteller Versuche des Graduiertenkollegs einer chronischen oralen Endotoxinbelastung (LPS von *Salmonella typhimurium*) ausgesetzt waren. Aus diesem Grund sollten morphologische Effekte von *Salmonella typhimurium*-LPS auf die Caco-2 Zellkultur mit Hilfe der Licht- und der Transmissionselektronenmikroskopie näher charakterisiert werden.

In weiteren Versuchen erfolgte die Inkubation der Caco-2 Zellkultur mit Rotaviren und mit *Salmonella typhimurium* (als Mono- und als Sekundärinfektion), um die Interaktionen der Erreger mit der Zellkultur ultrastrukturell und immunhistochemisch zu beurteilen und diese mit den Interaktionen der Erreger am Darm *in-vivo* zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurden an der Caco-2 Zellkultur (sieben/14 Tage alt; 12. bis 49. Passage) LPS- (Beimpfen mit 0; 0,1; 0,01; 0,001 und 1,0 mg/ml LPS von *Salmonella typhimurium* für eine bis 26 Stunden der sieben Tage alten Zellkultur) und Infektionsversuche (Inkubation mit $1 \times 10^{5,3}$ KID₅₀/ml Rotaviren für 17/72 Stunden **und/oder** 1×10^6 KBE/ml Salmonellen für drei/fünf Stunden) in Kooperation und unter Nutzung des Labors in der „Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere“ (BFAV) in Jena durchgeführt.

Eine detaillierte morphologische Charakterisierung der mit LPS- (n=42), mit Rotaviren- (n=7), mit Salmonellen- (n=7) sowie der mit Rotaviren **und** Salmonellen (n=13) inkubierten Caco-2 Zellkulturen sowie der Kontroll-Caco-2 Zellkulturen (n=41) erfolgte mit Hilfe der Licht- und der Transmissionselektronenmikroskopie sowie an repräsentativ ausgewählten Proben mittels immunhistochemischer Methoden (Ki-67 Antigen, PCNA, Nachweis von Rotavirus-, *Salmonella*-Antigen) und der TUNEL-Technik (Nachweis apoptotischer Zellen) im Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig.

Die Caco-2 Zellkultur weist morphologisch überwiegend vergleichbare Charakteristika von Enterozyten *in-vivo* auf.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass sich die infizierten Zellen von den nicht infizierten Zellen morphologisch lediglich in Abhängigkeit von der Erregeranzahl unterscheiden: Treten 100 oder mehr Rotaviren bzw. drei oder mehr Salmonellen innerhalb einer Zelle auf, kann ein ausgeprägtes „cloudy swelling“ im Zytoplasma der betroffenen Zellen beobachtet werden. Während das Zytoplasma der Zelle somit aufgelockert erscheint, sind die Zellorganellen, mit Ausnahme des gering- bis mittelgradig erweiterten rauen endoplasmatischen Retikulums, jedoch unverändert. Die Morphologie der mit LPS inkubierten Caco-2 Zellen entspricht der der Kontroll-Zellen. Vergleicht man die bisherigen Ergebnisse der im Rahmen des Graduiertenkollegs stattgefundenen *in-vivo* Versuche mit denen, die in dieser Studie *in-vitro* erzielt werden konnten, lässt sich eine Parallele aufzeigen: Endotoxine scheinen weder an den untersuchten Enterozyten aus den *in-vivo* Versuchen (orale Verabreichung) noch an den Caco-2 Zellen zu morphologisch erfassbaren Veränderungen zu führen. Im Anschluss an eine Infektion der Caco-2 Zellen mit Rotaviren **und/oder** Salmonellen kann immunhistochemisch sowohl Rotavirus- als auch Salmonella-Antigen nachgewiesen und ultrastrukturell eine Penetration der Erreger sowie eine Translokation der Salmonellen durch die Epithelzellen festgestellt werden, wobei nur sehr vereinzelt das Auftreten beider Erreger gemeinsam innerhalb einer Zelle der mit Rotaviren **und** Salmonellen infizierten Zellkultur beobachtet werden kann. Morphologische Hinweise für eine Virus- bzw. Bakterienvermehrung finden sich jedoch in den untersuchten Lokalisationen nicht. Mittels vergleichender Betrachtung der Sekundär- mit den jeweiligen Monoinfektionen kann festgestellt werden, dass unter Berücksichtigung der gleichen Bedingungen (Zellalter, Passagenanzahl, Expositionszeiten) keine Korrelationen zwischen der Anzahl der infizierten Zellen, deren Zellalter und/oder den variierenden Expositionszeiten auftreten, und dass keine Wechselbeziehungen zwischen der Erregeranzahl pro Zelle, dem Zellalter und/oder den Expositionszeiten bestehen.

Die Caco-2 Zellkultur stellt somit ein geeignetes Modell zum Studium „reiner“ Penetrationsmechanismen von Rotaviren und Salmonellen sowie für Translokationsvorgänge von *Salmonella typhimurium* an epithelialen Membranen, im Vergleich zum normalen Darmepithel, dar. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Caco-2 Zellkultur grundsätzlich als Modellsystem zur Translokation von Antigenen durch epitheliale Barrieren unter verschiedenen Bedingungen geeignet ist. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Problematik Schlachttierbelastung und Produktsicherheit mittels eines nach diesen Erfahrungen modifizierten Versuchsansatzes.

7. Summary

Michaela Möhring

The Caco-2 cell culture, a suitable *in-vitro* system for studies on antigen-dependent effects on enterocytes?

Institute of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in December 2003

(120 pages, 33 figures, 17 tables, 241 references, 10 pages appendices)

Keywords: Caco-2 cell culture, salmonella-LPS, rotaviruses, salmonella

The aim of the study was to evaluate the usefulness of the Caco-2 cell line as an *in-vitro* enterocyte model to show potential parallels to morphological alterations in the intestine of slaughter swine which were exposed to LPS of *Salmonella typhimurium* by a long-term alimentary infection within an experiment of the Research Training Group “Influence of Stress on Animals for Slaughtering and Safety of Animal Products”.

On this account, light- and transmission electron microscopical investigations were performed in order to: i) characterize the morphological effects of the *Salmonella typhimurium*-LPS on the Caco-2 cell culture, ii) determine the interactions by incubating the Caco-2 cell culture with rotaviruses and *Salmonella typhimurium* as a mono- and secondary infection, iii) compare the findings with the results of *in-vivo* experiments.

For that reason, LPS- (seven days old culture inoculated with; 0; 0,1; 0,001 and 1,0 mg/ml LPS of *Salmonella typhimurium* for one to 26 hours) and infection experiments (incubation with $1 \times 10^{5,3}$ PID₅₀/ml rotaviruses for 17/72 hours **and/or** 1×10^6 CFU/ml salmonella for three/five hours) were carried out with the Caco-2 cell culture (seven/14 days old; 12th to 49th passages) in cooperation with the Federal Research Centre of Virus Diseases of Animals, Jena, Germany.

At the Institute of Veterinary-Pathology of the University of Leipzig, a detailed morphological characterization of the control Caco-2 cell culture (n=41) and the Caco-2 cell culture incubated with LPS (n=42), rotavirus (n=7), salmonella (n=7) as well as both salmonella **and** rotavirus by means of light- and transmission electron microscopy was performed. Immunohistochemical studies (Ki-67 antigen, PCNA, detection of the rotavirus antigen and salmonella antigen) as well as the TUNEL-technique (detection of apoptotic cells) were carried out on representatively chosen specimens.

Morphologically, the Caco-2 cell culture reveals characteristics comparable to enterocytes *in-vivo*.

The ultrastructural studies show that the morphological differences between infected and non-infected cells solely depends on the number of causative organisms: in case of the presence of more than a hundred rotaviruses or three to more salmonella in one cell, these cells show a distinct “cloudy swelling” of the cytoplasm. Nevertheless the organelles of these cells remain unaffected except for a mild to moderate dilatation of the rough endoplasmatic reticulum. The morphology of the Caco-2 cells incubated with LPS corresponds to the control cells. Comparing these *in-vitro* findings with the results of the *in-vivo* experiments of the Research Training Group the following parallel is obvious: Morphologically detectable alterations due to endotoxines seem to occur neither *in-vivo* (oral administration) nor in Caco-2 cells.

After an infection of the Caco-2 cells with rotaviruses and/or salmonella, both antigens are detectable distinctly by means of immunohistochemistry. Ultrastructurally a penetration of the pathogens as well as a translocation of the salmonella through the epithelial cells can be discovered. In case the cell culture is infected with both rotaviruses and salmonella consecutively, a co-localisation of both organisms is very rarely seen. In none of the investigated specimens a proof of a viral or bacterial multiplication was obvious.

The comparison of the secondary infection with the relating monoinfections under equal conditions (age of the cell, number of passages and time of incubation) reveals no correlations between the number and the age of the infected cells and/or the time of incubation. In addition, no relation between the number of pathogens per cell, the age of the cell and/or the time period of exposition can be demonstrated.

In conclusion, compared to the normal intestinal epithelial layer, the Caco-2 cell culture is an appropriate model to investigate “pure” penetration mechanisms of rotaviruses and salmonella as well as the translocation processes of *Salmonella typhimurium* through epithelial membranes.

The results of this study indicate that the Caco-2 cell culture is a suitable *in-vitro* system for the translocation of antigens through an epithelial barrier under various conditions. This knowledge serves as a basis for further investigations regarding the problems of contaminated slaughter animals and product reliability by using a modified experimental design.

8. Literaturverzeichnis

Akedo I, Ishikawa H, Ioka T, Kaji I, Narahara H, Ishiguro S, et al. Evaluation of epithelial cell proliferation rate in normal-appearing colonic mucosa as a high-risk marker for colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:925-30.

Akhtar M, Watson JL, Nahli A, McKay DM. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF- κ B-independent pathway. *FASEB J* 2003;17:1319-21.

Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990;212:496-512.

Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Klein P, et al. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002;1:1735-43.

Anderson JM, van Itallie CM. Tight junction and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 1995;269:G467-75.

Anderson JM, van Itallie CM, Peterson MD, Stevenson BR, Carew EA, Mooseker MS. ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells. *J Cell Biol* 1989;109:1047-56.

Anderson JM, Balda MS, Fanning AS. The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:772-8.

Argenzio RA, Armstrong M. ANP inhibits NaCl absorption and elicits Cl secretion in porcine colon: evidence for cGMP and Ca mediation. *Am J Physiol* 1993;265:57-65.

Aschenbach JR, Seidler T, Ahrens F, Schrödl W, Buchholz I, Garz B, et al. Luminal Salmonella endotoxin affects epithelial and mast cell function in the proximal colon of pigs. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:791-26.

Bäumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Virulence Mechanisms of Salmonella and their genetic basis. In: Wray C, Wray A, editors. *Salmonella in domestic animals*. Wallington, UK: CABI Publishing; 2000. p. 57-67.

Baggiabihi M. Novel aspects of inflammation-interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *Clin Investig* 1993;71:812-4.

Barber IK, Van Dreumel AA, Palmer N. Alimentary tract. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, editors. Pathology of domestic animals. 4th ed., Vol. 2. London: Academic Press; 1993. p. 51-203.

Bass DM. Interferon gamma and interleukin 1, but no interferon alpha, inhibit rotavirus entry into human intestinal cell lines. *Gastroenterology* 1997;113:81-9.

Beachey EH. Bacterial adherence: adhesine-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 1981;143:325-45.

Biganzoli E, Cavenaghi LA, Rossi R, Burnati MC, Nolli ML. Use of a Caco-2 cell culture model for characterization of intestinal absorption of antibiotics. *Farmaco* 1999;54:594-9.

Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarraf AM. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res* 1980;40:2142-6.

Breves G, Diener M. Funktionen des Dickdarmes. In: Engelhardt WV, Breves G, Hrsg. Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke-Verlag; 2000. S. 394-402.

Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:248-57.

Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002;197:492-509.

Büttner M. Allgemeine Virologie. In: Mayr A, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2002. S. 65-144.

Bukholm G. Human Rotavirus infection enhances invasiveness of enterobacteria in MA-104 cells. *APMIS* 1988;96:1118-24.

Bukholm G, Degre M. Invasiveness of *Salmonella typhimurium* in HEp-2 cell cultures preinfected with Coxsackie B 1 virus. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1984;92:45-51.

Burell R. Human responses to bacterial endotoxin. *Circulatory Shock*. 1994;43:137-53.

Butler LM, Hewett RA, Fitridge RA, Cowled PA. Deregulation of apoptosis in colorectal carcinoma: theoretical and therapeutic implications. *Aust N Z J Surg* 1999;69:88-94.

Carrel A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J Exp Med* 1912;15:516-28.

Chang WWL, LeBlond CP. Renewal of the epithelium in the descending colon of the mouse. I. Presence of three cell populations: vacuolated-columnar, mucous and argentaffin. *Am J Anat* 1971;131:73-100.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988;48:1936-42.

Chopra DP, Yeh KY. Long-term culture of epithelial cells from the normal rat colon. *In Vitro* 1981;17:441-9.

Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* 1994;145:543-52.

Clark EC, Patel SD, Chadwick PR, Warhurst G, Curry A, Carlson GL. Glutamine deprivation facilitates tumour necrosis factor induced bacterial translocation in Caco-2 cells by depletion of enterocyte fuel substrate. *Gut* 2003;52:224-30.

Clarke RM, Hardy RN. Histological changes in the small intestine of the young pig and their relation to macromolecular uptake. *J Anat* 1971;108:63-77.

Collegio OR, van Italy CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C142-7.

Cruz N, Alvarez X, Berg RD, Deitch EA. Bacterial translocation across enterocytes: results of a study of bacterial-enterocyte interactions utilizing Caco-2-cells. *Shock* 1994a;1:67-72.

Cruz N, Alvarez X, Specian RD, Berg RD, Deitch EA. Role of mucin, mannose and beta-1-integrin receptors in *Escherichia coli* translocation across Caco-2-cell monolayers. *Shock* 1994b;2:121-6.

Cruz N, Lu Q, Alvarez X, Berg RD, Deitch EA. The Caco-2-cell monolayer system as an in-vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. *J Burn Care Rehabil* 1994c;15:207-12.

Darfeuille-Michaud A, Aubel D, Chauvier G. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infect Immunol* 1990;58:893-902.

David H. Elektronenmikroskopische Organpathologie. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit; 1967. S. 151-69.

David H, Uerlings I. Elektronenmikroskopische Befunde am Dünndarm des Kaninchens nach Gefäßunterbindung. *Exp Path* 1967;1:30-44.

Dedie' K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer KJ, Weinke T. Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Stuttgart: Enke-Verlag; 1993. S. 295-329.

Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990;30:184-9.

Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection. *J. Burn Care Res* 1987;8:475-82.

Deitch EA, Berg RD, Specian RD. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987;122:185-90.

Deitch EA, Specian RD, Berg RD. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med* 1991;19:785-91.

Del Castillo JR, Sepulveda FV. Activation of an $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport system by phosphorylation in crypt cells isolated from guinea pig distal colon. *Gastroenterology* 1995;109:387-96.

Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitation of the Caco-2 model. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1997;14:221-86.

Dharmasathaphorn J, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, Masui H. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol* 1984;246:G204-8.

Di Biase AM, Petrone G, Conte MP, Seganti L, Ammendolia MG, Tinari A, et al. Infection of human enterocyte-like cells with Rotavirus enhances invasiveness of *Yersinia enterocolica* and *Y. pseudotuberculosis*. *J Med Microbiol* 2000;49:897-904.

Dickman KG, Hempson SJ, Anderson J, Lippe S, Zhao L, Burakoff, et al. Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G757-66.

Diks SH, Van Deventer SJ, Pepellenbosch MP. Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. *J Endotoxin Res* 2001;7:335-48.

Dobbins WO. Human intestinal epithelium as a biological membrane. In: Trump BF, Arstila U, editors. *Pathology of cell membranes*. New York, San Francisco, London: Academic Press; 1975. p. 441-2.

Dorman CJ. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect Immun* 1991;59:745-9.

Duguid JP, Darekar MR, Wheeler DW. Fimbriae and infectivity of *Salmonella typhimurium*. *J Med Microbiol* 1976;9:459-73.

Eaves-Pyles T, Szabo C, Salzman AL. Bacterial invasion is not required for Activation of NF- κ B in enterocytes. *Infection and Immunity* 1999;67:800-4.

Ecknauer R. Die Barrierefunktion des Magen-Darm-Traktes. *Zschr Gastroent* 1982;20:150-63.

Egberts HJA, Koninkx JFJG, Van Dijk JE, Mouwen JMVM. Biological and pathobiological aspects of the glycocalyx of the small intestinal epithelium. *Vet Q* 1984;6:186-99.

Egberts HJA, Brinkhoff MGM, Mouwen JMVM, Van Dijk JE, Koninkx JFJG. Biology and pathobiology of intestinal M-cell. *Vet Q* 1985;7:333-6.

Ehinger B. Morphologische Veränderungen der Darmbarriere bei unterschiedlich belasteten Schlachtschweinen [Dissertation med.vet]. Leipzig: Univ. Leipzig;1998.

Elsinghorst EA, Baron LS, Kopecko DJ. Penetration of the human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:5173-7.

Farquahr MG, Palade GF. Junction complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.

Fehlhaber K, Schubert V, Krüger G. Einfluss von Organkrankheiten auf den praemortalen Belastungszustand von Schlachtschweinen. *Monatsh Veterinarmed* 1989;44:877-9.

Fehlhaber K, Stryczek E, Schüppel H. Untersuchungen zur lebensmittelhygienischen Bedeutung von Lungenveränderungen bei Schlachtschweinen. *Fleischwirtschaft* 1992;72:778-84.

Fernandez X, Magard M, Tornberg E. Variations in pig muscle dorsi glycolytic potential during transport and lairage – in-vivo studies. *Proceedings of the 34th Int Congr Meat Sci Techn* Kulmbach; 1991.

Fink MP. Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma and sepsis. *Crit Care Med* 1991;19:627-41.

Finlay BB. Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;192:163-85.

Finley BB, Falkow S. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J Infect Dis* 1990;162:1096-106.

Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In: Fogh J, editor. *Human tumor cells in vitro*. New York: Plenum; 1975. p. 115-41.

Foote S, Hook E. *Salmonella* species (including typhoid fever). In: Mandell L, editor. *Infectious disease and their etiological agents*. Vol. 3. New York: John Wiley and sons; 1979. p. 1730-50.

Freshney RI. *Culture of animal cells: A manual of basic techniques*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000.

Freudenberg MA, Ness T, Kumazawa Y, Galanos C. The role of cytokines in endotoxic shock and in endotoxin hypersensitivity. *Immun Infect* 1993;21:40-4.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998;141:1539-50.

Galan JE. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:46-50.

Galan JE, Curtiss R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:6383-7

Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival: Differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1540-54.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.

Gebbers JO, Laissue JA. Barrier function of the colonic mucosa: morphological aspects. *Microecol Ther* 1982;12:31-45.

Gebbers JO, Laissue JA. Functional morphology of the mucosal barrier. *Microecol Ther* 1984;14:137-68.

Ghadially FN. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 4th ed. Vol. 1,2. Boston, Oxford, Johannesburg, Melbourne, New Delhi, Singapore: Verlag Butterworth-Heinemann; 1997.

Gianella RA. Importance of the intestinal inflammatory reaction in *Salmonella*-mediated intestinal secretion. *Infect and Immun* 1979;23:140-5.

Gianella RA. *Salmonella*. In: Baron S, editor. *Medical microbiology*. 4th ed. Univ. of Texas; 1996.

Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor mediated endocytosis. *Nature* 1979;279:679-85.

Gordon JL, Hermiston ML. Differentiation of self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:795-803.

Gork AS, Usui N, Ceriati E, Drongowski RA, Epstein MD, Coran AG, et al. The effect of mucin on bacterial translocation in I-407 fetal and Caco-2 adult enterocyte cultured cell lines. *Pediatr Surg Int* 1999;15:155-9.

Grand RJ, Watkins JB, Torti EM. Development of the human gastrointestinal tract: A review. *Gastroenterology* 1976;70:790-810.

Griffith JF. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet Immunol Immunopathol* 1989;20:263-312.

Gumbiner B. Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 1987;253:749-758.

Harrison RG. Observations on the living developing nerve fibre. *Proc Soc Exp Biol Med* 1907;4:140-3.

Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JAM, Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolase in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985;101:838-851.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989;96:736-49.

Higgins CF, Hinton JCD, Hulton CSJ, Owen-Hughes T, Pavitt GD, Seirafi A. Protein H 1: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence? *Mol Microbiol* 1990;4:2007-12.

Hirschberger J. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. [Dissertation med. vet] Gießen: Justus-Liebig Univ. Gießen; 1987.

Honn KV, Singley JA, Chavin W. Fetal bovine serum: a multiariat standard (38805). *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;149:344-7.

Hull BE, Staehelin LA. The terminal web. *J Cell Biol* 1979;81:67-82.

Isaacson RE, Kinsel M. Adhesion of *Salmonella typhimurium* to porcine intestinal epithelial surfaces: identification and characterization of two phenotypes. *Infect Immun* 1992;60:3193-200.

Ito S. The enteric surface coat on cat intestinal microvilli. *J Cell Biol* 1965;27:475-91.

Iuvone T, Denbossche RV, D'Acquisto F, Carnuccio R, Herman AG. Evidence that mast cell degranulation, histamine and tumour necrosis factor alpha release occur in LPS-induced plasma leakage in rat skin. *Br J Pharmacol* 1999;128:700-4.

Jiwa S. Probing for enteropathogenicity among the Salmonellae: an evaluation of biological assays. *J clin Microbiol* 1981;14:463-72.

Johannessen JV. *Electron Microscopy in human medicine*. Vol. 3, New York, Hamburg, London, Paris, Toronto: McGraw-Hill International Book Company; 1980.

Jones BD, Gori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994;180:15-23.

Jourdan N, Cotte-Laffitte J, Forestier F, Servin AL, Quero AM. Infection of cultured human intestinal cells by monkey RRV and human Wa rotavirus as a function of intestinal epithelial cell differentiation. *Res Virol* 1995;146:325-31.

Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol* 1997;71:8268-78.

Kaaden OR. Viruskrankheiten der Tiere. In: Mayr A, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 7. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2002. S. 145-376.

Kane TD, Johnson SR, Alexander JW, Babcock GF, Ogle CK. Detection of intestinal bacterial translocation using PCR. *J Surg Res* 1996;63:59-63.

Kaup F-J. Die Normalstruktur der Darmbarriere des neugeborenen Kalbes und ihre Alterationen im Verlauf hypoxischer Situationen [Habilschr. med.vet] Hannover: Tierärztl. Hochsch.; 1993.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26.

Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiou JA, Groot JA, et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in jejunum. *Am J Physiol* 1998;275:1037-44.

Kirkpatrick C, Pfeifer M. Not just glue: cell-cell junctions as cellular signaling centers. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:56-65.

Kitamoto N, Ramig RF, Matson DO, Estes MK. Comparative growth of different rotavirus strains in differentiated cells (MA104, HeoG2, and Caco-2). *Virology* 1991;184:729-37.

2. Literaturübersicht

2.1 Morphologie des Darmes unter besonderer Berücksichtigung ultrastruktureller Charakteristika des Enterozyten

Die Dün- und Dickdarmwand gliedert sich, lumenseitig beginnend, in die Tela mucosa (Lamina epithelialis, Lamina propria mucosae, Lamina muscularis mucosae), die Tunica submucosa, die Tunica muscularis und die Tunica serosa (LIEBICH 1990).

Die Lamina epithelialis ist von der Lamina propria durch eine ca. 300 nm breite kontinuierliche Basalmembran, bestehend aus Kollagen, Glykoproteinen und Proteoglykanen, getrennt (OWEN 1988). Neben den Enterozyten kommen Becherzellen, M-Zellen, Paneth-Zellen, endokrine Zellen, undifferenzierte Stammzellen und intraepitheliale Lymphozyten vor (BRITTAN u. WRIGHT 2002).

Die größte Zellpopulation in allen Darmabschnitten stellen die Enterozyten (Abb. 2.1) dar (KERR et al. 1994).

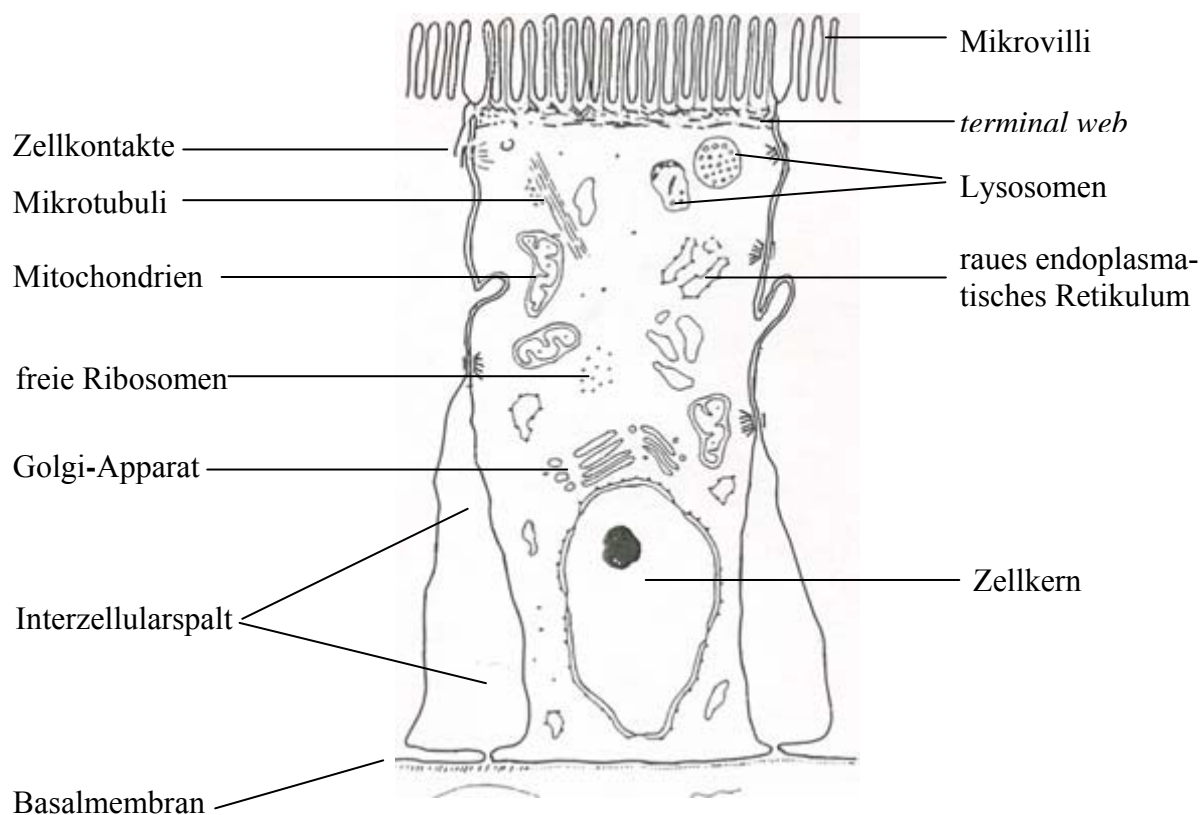


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Enterozyten (modifiziert nach TRIER 1968)

- Kohbata S, Yokoyama H, Yabuuchi E. Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine Peyer's patches in ligated ileal loops: and structural study. *Microbiol Immunol* 1986;30:1225-37.
- Konkel ME, Joens LA. Effect of enteroviruses on adherence to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* isolates. *Infect Immun* 1990;58:1101-5.
- Kopf-Maier P, Merker HJ. Atlas der Elektronenmikroskopie. Wien, Berlin: Verlag Ueberreuter Wissenschaft; 1989.
- Kotter L. Von der Qualität, der Hygiene und der Würde des Fleisches. *Fleischerei* 1996;10:4-5.
- Krüger M, Röpke M. Bakterielle Endotoxine - Ursachen für Erkrankungen bei Tieren. In: Endotoxinassoziierte infektiöse und nichtinfektiöse Erkrankungen bei Tieren. Leipzig: 1997; S. 7-12.
- Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 2002;82:245-89.
- Lecce JG, Balsbaugh RK, Clare DA, King MW. Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weanling diarrhea of pigs. *J Clin Microbiol* 1982;16:715-23.
- Liebermann H. Genus Rotavirus. In: Liebermann H, Hrsg. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie. Jena: Verlag Gustav Fischer; 1992. S. 43-4.
- Liebich HG. Funktionelle Histologie. Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. Stuttgart: Verlag Schattauer; 1990.
- Lindl L. Zell- und Gewebekultur. 4. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 1999.
- Lindquist BL, Lebenthal LE, Lee PC, Stinson MW, Merrick JM. Adherence of *Salmonella typhimurium* to small-intestinal enterocytes of the rat. *Infect Immun* 1987;55:3044-50.
- Lipkin M, Bell B, Sherlock P. Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. I. Cell renewal in colon and rectum. *J Clin Invest* 1963;42:767-76.

Llovet JM, Bartoli R, Planas R. Intestinal bacterial translocation. *Gastroenterol Hepatol* 1996;19:374-82.

Loos M, Wassenaar TM. Pathogenitätsfaktoren von enteritischen Salmonellen. *Immun Infekt* 1994;22:14-19.

Louvard D, Arpin M, Coudrier E, Huet C, Pringault E, Robine S, et al. Experimental manipulation of intestinal cell differentiation using a human adenocarcinoma cell line (HT-29). *J Cell Biol* 1984;99:134-45

MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: A prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999;45:223-8.

Madara JL. Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? *Cell* 1988;53:497-8.

Maddaus MA, Wells CL, Billart T, Simmons RL. Simple mechanical intestinal obstruction induce translocation of gram-negative bacteria to the mesenteric lymph nodes. *Surg Forum* 1986;36:186-6.

Maddaus MA, Wells CL, Platt JL, Condie RM, Simmons RL. Effects of T-cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph nodes. *Ann Surg* 1988;207:387-98.

Mandara JL, Dharmasathahorn K. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J Cell Biol* 1985;101:2124-33.

Mandel KG, McRoberts JA, Beuerlein G, Foster ES, Dharmasathahorn K. Ba^{2+} inhibition of VIP- and A23187-stimulated Cl^- secretion by T84 cell monolayers. *Am J Physiol* 1986;250:C486-94.

Martin F, Knobel S, Martin M, Bordes M. A carcinofoetal antigen located on the membrane of cells from rat intestinal carcinoma in culture. *Cancer Res* 1975;35:333-6.

Martin MG, Wu SV, Walsh JH. Hormonal control of intestinal Fe receptor gene expression and immunoglobulin transport in suckling rats. *J Clin Invest* 1993;91:2844-9.

Martin MG, Wu SV, Walsh JH. Ontogenetic development and distribution of antibody transport and Fe receptor mRNA expression in rat intestine. *Dig Dis Sci* 1997;42:1062-9.

Matsuda M, Misumi A, Shimada S, Nelson RL, Akagi M. Quantitative electron microscopic study on grades of atypia in adenomas of the human large bowel. *Dis Colon Rectum* 1989;32:57-63.

Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG. Probiotics up-regulate MUC-2 mucine gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int* 2002;18:586-90.

McAdaragh JP, Bergeland E, Meyer RC, Johnshoy MW, Stotz IJ, Benfield DA, et al. Pathogenesis of rotaviral enteritis in gnotobiotic pigs: a microscopic study. *Am J Vet Res* 1980;41:1572-81.

McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL. Transepithelial signaling to neutrophils by *Salmonellae*: A novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 1993;63:2302-9.

McCullough LK, Takahashi Y, Le T, Pittman QJ, Swain MG. Attenuated febrile response to lipopolysaccharide in rats with biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G172-7.

McRoberts JA, Beuerlein G, Dharmasathahorn K. Cyclic AMP and Ca^{2+} -activated K^{+} transport in a human colonic epithel cell line. *J Biol Chem* 1985;260:14163-72.

Mebus CA, Newman LE. Scanning electron, light and immunfluorescent microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with rotavirus-like agent. *Am J Vet Res* 1977;38:553-8.

Messier B, Leblond CP. Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine- H^3 into rats and mice. *Am J Anat* 1960;106:247-94.

Meyerholz DK, Stabel TJ. Comparison of early ileal invasion by *Salmonella enterica* serovars cholerasuis and typhimurium. *Vet Pathol* 2003;40:371-5.

Meyerholz DK, Stabel TJ, Ackermann MR, Carlson SA, Jones BD, Pohlenz J. Early epithelial invasion by *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 in the swine ileum. *Vet Pathol* 2002;39:712-20.

Miller LJ, Marx J. Apoptosis. *Science* 1998;281:1301-26.

Modalsli KR, Bukholm G, Holberg-Peterson M, Degre M. *Shigella flexneri* adherence to and multiplication in Cossackie B1 virus-infected HEP-2 cells. *APMIS* 1995;103:254-60.

Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Gianella RA. Attaching and effecting activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pigs and rabbit intestines. *Infect Immunol* 1983;41:1340-51.

Motta PM, Fujita H. Ultrastructure of the digestive tract. Boston: Martinus Nijhoff Publishers; 1988.

Murakami H, Masui H. Hormonal control of colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77:3464-8.

Narita M, Fukusho A, Konno S, Shimizu Y. Intestinal changes in gnotobiotic piglets experimentally inoculated with porcine rotavirus. *Natl Inst Anim Health* 1982;22:54-60.

Nerem RM. Role of mechanics in vascular tissue engineering. *Biorheology* 2003;40:287-7.

Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985;49:1-32.

Niv Y, Byrd JC, Ho SB, Dahiya R, Kim YS. Mucin synthesis and secretion in relation to spontaneous differentiation of colon cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 1992;50:147-52.

Nolan JP, Hara DK, McDevitt JJ, Ali MV. In vitro studies of intestinal endotoxin absorption: I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 1977;72:434-9.

Noltenius H. Tumoren des Dickdarmes und des anorektalen Bereiches. In: Noltenius H., Hrsg. Tumor Handbuch. Pathologie und Klinik der menschlichen Tumore. 2. Aufl. Bd. 1. München: Verlag Urban und Schwarzenberg; 1987. S. 327-83.

Obert G, Pfeiffer I, Servin AL. Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Virol* 2000;74:4645-51.

O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998;42:29-35.

O'Donnell RW, Cockerell GL. Establishment and biological properties of guinea pig colonic adenocarcinoma cell line induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 1981;41:2372-7.

Oelschlaeger TA, Guerry P, Kopecko DJ. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6884-8.

Okada N, Nishio M, Danbara H. Intracellular activity of Fosfomycin against two distinct enteropathogenic bacteria, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*, alive inside host cells. *Chemotherapy* 2003;49:49-55.

Olmsted CA. A physico-chemical study of fetal calf sera used as tissue culture nutrient correlated with biological tests for toxicity. *Cell Res* 1967;48:283-99.

Owen RL. Antigen uptake and processing from the intestinal mucosa. *Proceedings of the 23th Annual Meeting of the American Society of Veterinary Clinical Pathologists*; Kansas City, USA; 1988. p. 148-58.

Owen RL, Pierce NF, Apple RT, Cray WC. M-cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial trans epithelial migration. *J Infect Dis* 1982;153:1108-18.

Pace J, Hayman MJ, Galan JE. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* 1993;72:505-14.

Pacha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 2000;80:1633-67.

Padykula HA. The digestive tract. In: Weiss L, Greep RO, editors. *Histology: Cell and tissue biology*. 4th ed. Amsterdam: The Macmillan Press; 1977. p. 643-99.

Pageot LP, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P, Beaulieu JF. Human cell models to study small intestinal functions: Recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech* 2000;49:394-406.

Panigrahi P, Gewolb ICH, Bamford P, Horvath K. Role of glutamine in bacterial transcytosis and epithelial cell injury. *J Parenter Enteral Nutr* 1997;21:75-80.

Paul PS, Stevenson GW. Rotavirus and Reovirus. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Disease of Swine*. 7th ed. Iowa: Iowa State University Press/AMES; 1992. p. 331-48.

Perdikis DA, Davis R, Zhuravkov A, Brenner B, Etter L, Basson MD. Differential effects of mucosal pH on human (Caco-2) intestinal epithelial cell motility, proliferation, and differentiation. *Dig Dis Sci* 1998;43:1537-46.

Pietzsch O. Salmonella. In: Blobel H, Schliesser T, Hrsg. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Bd. 3. Jena: VEB Fischer Verlag; 1981. S. 344-452.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triduo N, Dussaulx E, et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biol Cell* 1983;47:323-30

Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW. Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-white scheme. *Res Microbiol* 2000;151:63-4

Rajendran VM, Binder HJ. Distribution and regulation of apical Cl/anion exchangers in surface and crypt cells of rat distal colon. *Am J Physiol* 1999;276:132-7

Rechkemmer G. Effects of a low-sodium diet on electrolyte transport in the proximal and distal colon of the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1992;103A:501-5

Reed WM, Olander HJ, Thacker HL. Studies on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* var *kunzendorf* infection in weanling pigs. *Am J Vet Res* 1986;47:75-83.

Revel JP. Intercellular communication. In: Stanley SE, editor. *The paracellular pathway*. New York: E.F. Purcell, Josiah May Foundation; 1982. p. 57-82.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high phase an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-12.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992;267:54-61.

Rietschel ET, Brade H, Schade FU, Seydel U, Zähringer U, Mamat U, et al. Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung. *Immun Infekt* 1993a;21:26-35.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade U, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* 1993b;187:169-90.

Riley SA, Warhurst G, Crowe PT, Turnberg LA. Active hexose transport across cultured human Caco-2 cells: characterization and influence of culture conditions. *Biochim Biophys Acta* 1991;1066:175–182.

Rodriguez-Boulau E, Nelson WJ. Morphogenesis of polarized epithel cell phenotype. *Science* 1989;245:718–25.

Rousset M, Dussaulx E, Chevalier G, Zweibaum A. Growth-related glycogen levels of human intestine carcinoma cell lines grow in vitro and vivo in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1980;65:885-9.

Rousset M, Laburthe M, Pinto M, Chavalier G, Rouyer-Fessard C, Dussaulx E, et al. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. *J Cell Physiol* 1985;123:377-85.

Rubas W, Cromwell MEM, Shahrokh Z, Villagran J, Nguyen TN, Wellton M. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J Pharm Sci* 1996;85:165-9.

Ruchti CH, Gerber HA, Hess MW, Keller HU, Cottier H. Zur Barrierefunktion des menschlichen Darms: Mechanismen des Antigeneintritts und der antimikrobiellen Schutzfunktionen. *Ther Umsch* 1980;37:161-7.

Sagar PM, MacFie J, Sedman J, May P, Mancey-Jones B, Johnstone D. Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis Colon Rectum* 1995 ;38:640-4.

Sawai T, Lampman R, Hua Y, Segura B, Drongowski RA, Coran AG, et al. Lysophosphatidylcholine alters enterocyte monolayer permeability via a protein kinase C/ Ca^{2+} mechanism. *Pediatr Surg Int* 2002;18:591-4.

Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 1992;262:647-61.

Schröder R. Nachweis intrazellulärer Salmonellen in phagozytierenden Zellen. [Dissertation med.vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2002.

Schröder M, Diener M. Grundlagen der Zellbiologie. In: Engelhardt WV, Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke-Verlag; 2000. S. 5-22.

Schüppel H, Fehlhaber K, Stryczek E. Endogene Kontamination bei Schlachttieren. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1994;107:23-9.

Schüppel H, Salchert F, SCHÜPPEL K-F. Investigations into the influence of mastitis and other organ changes on microbial contamination of the meat of slaughter cows. Fleischwirtschaft 1996;76:61-64.

Schulz V. Untersuchungen über den Einfluss der Ruhezeit zwischen Transport und Schlachtung auf die Häufigkeit des Auftretens von Salmonellen beim Schwein. [Dissertation med.vet]. Gießen: Justus-Liebig-Univ., 1983.

Schwartz KJ. Salmonellosis in swine. Compend Contin Educ Pract Vet 1991;13:139-46.

Schwartz KJ. Salmonellosis. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. 8th ed. Iowa: Iowa State University Press/AMES; 1999. p. 139-46.

Seibert FS, Chang XB, Aleksandrov AA, Clarke DM, Handrahan JW, Riordan JR. Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta 1999;1461:275-83.

Seidler T. Freies Endotoxin in der Blutzirkulation von Schlachtschweinen: Eine Ursache für bakterielle Translokationen. [Dissertation med.vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1998.

Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Mayr A, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2002. S. 417-588.

Selbitz HJ, Sinell HJ, Sziegoleit A. Das Salmonellen-Problem: Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1995.

Shen WH, Xu RJ. Gastrointestinal stability and absorption of insulin in suckling pigs. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2000;125:389-401.

Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. Pharm Res 2002;19:715-28.

Smollich A, Michel G. Mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. 2. Aufl. Jena: Verlag Gustav Fischer; 1992.

Snodgrass DR, Smith ML, Krautil FL. Interaction of rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli in conventionally-reared dairy calves. Vet Microbiol 1982;7:51-60.

Staehelin LA. Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol* 1974;39:191-284.

Staley TE, Wynn E, Corley LD. Attachment and penetration of *E. coli* into epithelium of the ileum in newborn pigs. *Am J Path* 1969;56:371-92.

Steinhardt M, Lyhs L. Pathophysiologische Aspekte der Transportbelastung beim Schwein. 1. Mitt: Wärmehaushalt, Kreislauf, Wasserhaushalt. *Monatsh Veterinarmed* 1974;29:56-63.

Superti F, Petrone G, Pisani S, Morelli R, Ammendolia MG, Seganti L. Superinfection by *Listeria monocytogenes* of cultured human enterocyte-like cells infected with Poliovirus or Rotavirus. *Med Microbiol Immunol* 1996;185:131-7.

Suzuki Y, Kaneko K, Maruyama M, Hayashi H. Basolateral $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in epithelial cells from guinea pig distal colon. *Jpn J Physiol* 1994;44:305-7.

Svensson L, Finlay BB, Bass D, von Bonsdorff CH, Greenberg HB. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol* 1991;65:4190-7.

Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-7.

Takeuchi A. Electron microscopic studies of experimental salmonella infection. *Am J Path* 1967;50:109-36.

Tay SCK, Robinson RA, Pullen MM. Salmonella in the mesenteric lymph nodes and cecal contents of slaughtered sows. *J Food Prot* 1989;52:202-3.

Tidball CS. The nature of the intestinal epithelial barrier. *Dig Dis Sci* 1971;16:745-67.

Traber PG. Differentiation of intestinal epithelial cells: lessons from the study of intestine-specific gene expression. *J Lab Clin Med* 1994;123:467-77.

Trier JS. Morphology of the epithelium of the small intestine. In: Code CF, editor. *Handbook of physiology*, sec. 6, Alimentary canal. Washington (DC): American Physiological Society; 1968. p. 1125-75.

Trier JS, Mandara JL. Functional morphology of the mucosa of the small intestine. In: Johnson LR, editor. Physiology of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press; 1981. p. 925-61.

Tsuji A, Taimai I. Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm Res* 1996;13:963-77.

Turner JR, Lencer WI, Carlson S, Mandara JL. Carboxy terminus VSV-G tagged intestinal Na⁺-glucose transporter (SGLT1): maintenance of surface expression and global transport function with selective perturbation of transport kinetics and polarized expression. *J Biol Chem* 1996;271:7738-44.

Tzipori S, Chandler D, Makin T, Smith M. Escherichia coli and rotavirus infections in four-week-old gnotobiotic piglets fed milk or dry food. *Aust Vet J* 1980;56:279-84.

Uc A, Britigan BE. Does Heme Oxygenase-1 have a role in Caco-2 cell cycle progression? *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:590-5.

Vaara M, Viljanen P, Vaara T, Mäkelä PH. An outer membrane-disorganizing peptide PMBN sensitises E. coli strains to serum bacterial action. *J Immunol* 1984;132:2582-9.

Vaisman N, Leipovitz E, Dagan R, Barak V. The involvement of IL-6 and IL-8 in acute invasive gastroenteritis of children. *Cytokine* 2003;22:194-7.

van Dullemen H, Meenan J, Stronkhorst A, Tytgat GNJ, van Deventer SJ. Mediators of mucosal inflammation: implications for therapy. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:92-8.

van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S, et al. Clinical significance of translocation. *Gut* 1994;35:28-34.

van Regenmortel MH, Mayo MA, Fauquet CM, Maniloff J. Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol* 2000;145:2227-32.

Vidyasagar S, Ramakrishna BS. Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon. *J Physiol* 2002;539.1:163-73.

Vives E, Richard JP, Rispal C, Lebleu B. TAT peptid internalisation: Seeking the mechanism of entry. *Curr Protein Pept Sci* 2003;4:125-32.

Walker WA, Isselbacher KJ. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders. *Gastroenterology* 1974;67:531-50.

Walker WA, Isselbacher KJ. Intestinal antibodies. *N Engl J Med* 1977;297:767-73.

Warris PD. The effect of time and conditions of transport and lairage on pig meat quality. In: Tarrant PV, editor. *Evaluation and control of meat quality in pigs*. Dordrecht: Mart. Nijhoff publ.;1994. p. 245-64.

Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988;10:958-79.

Wells CL, Jechorek RP, Olmsted JB, Erlandsen SL. Effects of LPS on epithelial integrity and bacterial uptake in the polarized human enterocyte-like cells line Caco-2. *Circ Shock* 1993;40:276–88.

Wells CL, Jechorek RP, Olmsted JB, Erlandsen SL. Bacterial translocation in cultured enterocytes: magnitude, specificity, and electron microscopic observations of endocytosis. *Shock* 1994;1:443-51.

Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res* 1989;50:1015-21.

Yao Y, Bahrami S, Leichtfried G, Redl H, Schlag G. Pathogenesis of haemorrhage-induced bacteria/endotoxin translocation in rats. Effects of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein. *Am Surg* 1995;221:398-405.

Yeh KY, Chopra DP. Epithelial cell cultures from the colon of the suckling rat. *In Vitro* 1980;16:976-86.

Zähringer U, Sonesson HR, Grimmecke HD, Westphal O, Rietschel ET. Bacterial endotoxin – chemical structure and biological activity. In: Brigham KL, editor. *Endotoxin and the lungs*. New York, Basel, Hong Kong: M. Dekker; 1994. p. 1–20.

Zhou D, Chen LM, Hernandez L, Hears SB, Galan JE. A salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* 2001;39:248-59.

Zucker BA, Krüger M. Auswirkungen von Transportbelastungen auf den Endotoxingehalt im Blut von Schlachtschweinen. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1998;111:208-10.

Zweibaum A. Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cell lines: negative modulation by D-glycose. In: Alvarado F, Vanos CH, editors. Ion gradient-coupled transport. Amsterdam: Elsevier; 1986. p. 345-53

Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, et al. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. J Cell Physiol 1985;122:21-9

Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In: Handbook of physiology: The gastroenteral system. Vol. 4: Intestinal Absorption and secretion. 1991. p. 223-255

9. Anhang

9.1 Subkultivierung der Caco-2 Zellkultur

1. verbrauchtes Kulturmedium von dem, in einer sterilen 25 cm²-Flasche (Fa. Corning, Wiesbaden, Nr. 3055) gewachsenen, Zellrasen absaugen
2. 1x Waschen mit 6-7 ml einer 37°C warmen sterilen PBS-Lösung (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. P 14-1000 WAST) (pH-Wert: 7,2-7,4)
3. Zugabe von ca. 2 ml einer 37°C warmen sterilen Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. E 12-1000 Tryp) (pH-Wert: 7,2-7,3), für 2,5 min bei Zimmertemperatur
4. Abnahme der Trypsin-EDTA-Lösung
5. 1 ml einer 37°C warmen sterilen Trypsin-EDTA-Lösung zugeben, zur Vereinzelung der Zellen für 30 min. in den Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) stellen
6. Aufnahme der Zellsuspension mittels steriler Pipette in 2-3 ml sterilem DMEM (Medium, Life Technologies, Karlsruhe, Nr. 41965039) (pH-Wert: 7,2-7,4), in ein steriles Zentrifugenröhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Nr. 7163160) überführen, 8 min bei 200 x g zentrifugieren
7. Überstand absaugen, Zellpellet in 2-3 ml sterilem frischem Medium aufnehmen
8. 0,1 ml der Zellsuspension in die sterile Pipette aufnehmen, Zellzahlbestimmung (Kapitel 9.2)
9. 5 ml des sterilen frischen Dulbecco's modified Eagle's mediums (DMEM) in eine 25 cm² große sterile Kulturflasche vorlegen, berechnete Menge Zellsuspension zugeben
10. Inkubation bei 37°C und einer 5 % igen CO₂-Konzentration

9.2 Zellzahlbestimmung

1. 0,1 ml der zu zählenden Zellsuspension steril entnehmen, in ein steriles Röhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Nr. 7163160) pipettieren
2. 0,9 ml PBS (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. P 14-1000 WAST) dazugeben
3. Reinigung der Zählkammeroberfläche (Neubauer) (Fa. Fein-Optik, Bad Blankenburg) und des Deckgläschens mit Alkohol, Deckgläschen leicht anfeuchten, auf die Zählkammer schieben, bis sogenannte Newton'sche Ringe sichtbar werden
4. 0,01 ml der Zellsuspension in die Zählkammer füllen
5. 4 große Quadrate diagonal auszählen
6. Mittelwert mit 10⁴ (Kammervolumen) multiplizieren, errechneten Wert mit 10 multiplizieren (Verdünnungsfaktor), ergibt die Zellkonzentration pro Milliliter

9.3 Herstellung der Rotavirussuspension

Gebrauchslösung

80 µl Virusstammlösung (von H.-J. Streckert, Ruhr-Universität Bochum) mit 20 ml PBS⁺ (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. P 14-1000BSZE) (pH-Wert: 7,2-7,4) verdünnen

Virusaktivierung

1. 40 µl Trypsinlösung (Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. E 12-1000 Tryp) mit 1 ml Gebrauchslösung bei 37°C 30 min inkubieren
2. mit 0,4 ml dieser Virussuspension den Zellrasen in den Millicell[®]-Einsätzen beimpfen, für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubieren
3. Virussuspension absaugen, 1 x mit PBS⁺-Puffer (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. P 14-1000BSZE) (pH-Wert: 7,2-7,4) waschen

Virusinfizierung

1. 40 µl Trypsinlösung (Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. E 12-1000 Tryp) / 10 ml DMEM (Life Technologies, Karlsruhe, Nr. 41965039) (pH-Wert: 7,2-7,4) verdünnen
2. 0,3 ml Trypsin/Medium-Lösung auf die Caco-2 Zellen aufpipettieren, für 17 h bzw. 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubieren
3. Trypsin/Medium-Lösung absaugen, 1 x Waschen mit PBS⁺-Puffer (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. P 14-1000 BSZE) (pH-Wert: 7,2-7,4)

9.4 Herstellung der Salmonellensuspension

Gebrauchslösung

1 ml Salmonellenstammlösung (BFAV, Jena) mit 20 ml (DMEM (Life Technologies, Karlsruhe, Nr. 41965039) (pH-Wert: 7,2-7,4) verdünnen

Salmonelleninfizierung

1. 0,4 ml der Salmonellengebrauchslösung auf die 1x mit PBS⁺-Puffer (Fa. Dr. Hollborn, Leipzig, Nr. P 14-1000 BSZE) (pH-Wert: 7,2-7,4) gewaschenen Caco-2 Zellen aufpipettieren und für 3 h bzw. 5 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubieren
2. Salmonellengebrauchslösung absaugen und 1 x mit PBS⁺-Puffer waschen

9.5 Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchung

9.5.1 Vorbehandlung

1. Aufziehen von 3-4 µm dicken Schnitten auf Super-Frost Plus Objektträger (Fa. Menzel-Gläser).
30 min Trocknen bei Raumtemperatur vor einem Ventilator, anschließend Lagerung über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C
2. Entparaffinierung und Rehydrierung

- 10 min Roti[®]-Histol (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 2 x je 3 min Isopropanol
- 3 min 96% Alkohol
- 3. Inaktivierung der endogenen Peroxidase
30 min in Methanol mit frisch zugesetztem 0,5 % igem H₂O₂ bei Raumtemperatur
(Pethydrol 30 % H₂O₂ p.a., 7210, E. Merck, Dortmund)
- 4. Waschen in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)

9.5.2 Besondere Verfahren

Vor dem Aufbringen der Objektträger auf die Coverplates[®] wurde zunächst zum Nachweis des Ki67-Antigens und des PCNA's eine Zitrat-Behandlung durchgeführt.

Zitrat-Behandlung

1. 10 mM Zitratpuffer (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) pH 6,0 (Ki 67-Antigen) bzw. pH 4,0 (PCNA) auf 96°C vorwärmen
2. 30 min (Ki67-Antigen) bzw. 15 min (PCNA) Kochen der Schnitte in 96°C heißem Zitratpuffer
3. 30 min (Ki 67-Antigen) bzw. 15 min (PCNA) bei Zimmertemperatur abkühlen lassen
5. Spülen in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)

9.5.3 Antigennachweis mittels monoklonaler Antikörper nach der PAP-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates[®]
(Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main, Nr. 721100013)
2. Einbringen von je 100 µl in 1 % BSA (Fa. Boehringer, Mannheim, Nr. 3895) in TBS (Ki-67 Antigen, s. Kap. 9.7, verwendete Antikörper und Seren) (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) verdünnten Primärantikörpers (beziehungsweise des Kontrollserums) in die Coverplates[®]
Inkubation über Nacht bei 4°C
3. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®]
4. Einbringen von je 100 µl Ratte anti-Maus IgG 1:100 in 1 % BSA in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®] (Bovines Serum Albumin, Fa. Boehringer, Mannheim, Nr. 3895)
30 min Inkubation bei Raumtemperatur
5. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®]
6. Einbringen von je 100 µl Maus-PAP 1:500 in 1 % BSA in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®]
30 min Inkubation bei Raumtemperatur
7. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®] und weiter mit **Abschnitt 9.5.5 (Standard zur Nachbehandlung)**

9.5.4 Antigennachweis mittels polyklonaler Antikörper nach der PAP-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates[®] (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main, Nr. 721100013) Blocken der unspezifischen Bindungen mit 1:2 verdünntem Schweineserum in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) 10 min bei Raumtemperatur
2. Einbringen von je 100 µl des in 20 % igem Schweineserum in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) verdünnten Primärantikörpers (s. Kap. 9.7, verwendete Antikörper und Seren) in die Coverplates[®] Inkubation über Nacht bei 4°C
3. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®]
4. Einbringen von je 100 µl Schwein-anti-Kaninchen IgG 1:100 in 20 % igem Schweineserum in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®] 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
5. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®]
6. Einbringen von je 100 µl Kaninchen-PAP 1:100 in 20 % igem Schweineserum in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®] 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
7. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) je Coverplate[®] weiter mit **Abschnitt 9.5.5 (Standard zur Nachbehandlung)**

9.5.5 Standard zur Nachbehandlung

1. Wechseln der Schnitte aus den Coverplates[®] in eine Küvette
2. 10 min Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in 3,3. Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat (DAB), Fa. Fluka, Neu Ulm) mit 0,01 % igem H₂O₂ (30 %) in 0,1 M Imidazolpuffer (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) (pH 7,1) bei Raumtemperatur
3. 3 x 5 min Waschen in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) bei Raumtemperatur
4. 5 min Waschen in Aqua dest. bei Raumtemperatur
5. 10 Sekunden Gegenfärben mit PAPANICOLAOUs Lösung (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) und 5 min Bläuen in Leitungswasser
6. Je 3 min Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe
5 min Roti[®]-Histol
5 min Roti[®]-Histol
10 min Xylol
7. Eindecken der Objektträger

9.6 Verwendete Antikörper und Seren für die Immunhistologie

Primärantikörper

Die Primärantikörper, ihre Bezugsquelle sowie die verwendeten Verdünnungen sind der folgenden Übersicht zu entnehmen:

Primärantikörper	mono- /polyklonal	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus anti-Human Ki67-Antigen	monoklonal	1:10	NCL-Ki-67-MM1 Medac Diagnostika, Hamburg
Maus anti-PCNA	monoklonal	1:100	M 0879 Dako, Hamburg
Rotavirus	monoklonal	1:50	BIO 019 Bio X Diagnostics, Marche-en-Famenne, Belgien
Salmonellen	polyklonal	1:100	Institut für Immunologie

Schweineserum

Das von Schlachtschweinen stammende Serum wurde sterilfiltriert, zur Konservierung mit 0,05% Mertiolat versetzt und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

Sekundäre Antikörper

Als Sekundärantikörper für **monoklonale Primärantikörper** nach der Peroxidase anti-Peroxidase Methode wurde 1:100 in 1 % BSA in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) verdünntes Ratte anti-Maus IgG (Fa. Dianova GmbH, Hamburg, Nr. 415005100) eingesetzt.

Als Sekundärantikörper für **polyklonale Primärantikörper** nach der Peroxidase anti-Peroxidase Methode wurde 1:100 in 20 % igem Schweineserum in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) verdünntes Schwein-anti-Kaninchen IgG (Fa. DAKO, Hamburg, ZO 196) verwendet.

Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Komplex

Als PAP-Komplex für die **monoklonalen Primärantikörper** diente eine 1:500 in 1 % BSA in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) verdünnter Maus-PAP (Fa. Dianova Diagnostika GmbH, Hamburg, Nr. 223005025).

Als PAP-Komplex für die **polyklonalen Primärantikörper** wurde ein 1:100 in 20 %igem Schweineserum in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) verdünnter Kaninchen-PAP (Fa. DAKO, Hamburg ZO113) eingesetzt.

Kontrollseren

Als Kontrollserum (Negativkontrolle) für die **monoklonalen Antikörper** aus der Maus wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantige von Hühner-Bursa-Lymphozyten (T1; HIRSCHBERGER 1987) verwendet.

Als Negativkontrolle für **polyklonaler Antikörper** aus dem Kaninchen wurden die Schnitte jeweils parallel mit Kaninchenserum (Fa. DAKO, Hamburg, X0902) inkubiert.

9.7 Durchführung der TUNEL-Technik

1. Entparaffinierung und Rehydrierung
10 min Roti[®]-Histol (Fa. Roth, Karlsruhe)
2 x je 3 min Isopropanol
3 min 96 % Alkohol
3 min 80 % Ethanol
3 min 70 % Ethanol
2 x 2 min Aqua bidest.
2. DNA nick end-labeling
5 min TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) bei Raumtemperatur
15 min Inkubation mit Protease K (Fa. Fluka, Taufkirchen, Nr. 82456 10 mg/ml)
3 µl/ml TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) in einer feuchten Kammer
Wechsel der Schnitte in eine Küvette
4 x 2 min spülen mit Aqua bidest.
3. Blocken der endogenen Peroxidase
Inkubation der Schnitte 30 min bei Raumtemperatur in 2 % H₂O₂ (10 ml H₂O₂ + 140 ml Aqua bidest.)
4. 3 x 2 min Spülen mit Aqua bidest.
5. 10 min Inkubation mit TdT-Puffer (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) bei Raumtemperatur
6. Wechsel der Schnitte in die feuchte Kammer
7. 10 min Inkubation mit TdT (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 220582) (1:20 verdünnt mit 50 % Glycerol-PBS) + Biotin-dUTP (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 1093070) (1:10 in PBS verdünnt) in TdT-Puffer (425 µl) (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) bei 37°C
8. Wechsel der Schnitte in eine Küvette
9. 2 x 5 min inkubieren mit TB-Puffer (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)
10. 5 min inkubieren in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)
11. Wechsel der Schnitte in die feuchte Kammer
12. 20 min inkubieren mit 3 % BSA in TBS bei Raumtemperatur
13. 5 min inkubieren in TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)
14. 30 min inkubieren mit ABC/HPR bei Raumtemperatur
15. Wechsel der Schnitte in eine Küvette
16. spülen mit TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)
17. 20 min inkubieren in DAB (s.o.) unter ständigem Rühren
18. spülen mit TBS (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)
19. spülen mit Aqua bidest.

20. 10 Sekunden Gegenfärben mit PAPANICOLAOUs Lösung (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) und
5 min Bläuen in Leitungswasser
21. Je 3 min Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe
5 min Roti[®]-Histol
5 min Roti[®]-Histol
10 min Xylol
22. Eindecken der Objektträger

Ein Schnitt, der als Positivkontrolle diente, wurde einer DNase-Behandlung unterzogen:

5 min Inkubation in DN-Puffer (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8)

10 min Inkubation in Dnase I (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 776785, RNase frei)

250-500 Units in DN-Puffer (s. verwendete Lösungen und Puffer, Kap. 9.8) bei Raumtemperatur

waschen in Aqua bidest.

9.8 Verwendete Lösungen und Puffer für die Immunhistologie und die TUNEL Technik

Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung:

60,57 g Tris- (hxdroxymethyl) aminomethan (Fa. Roth, Karlsruhe)

610 ml Aqua dest.

390 ml HCL 1 N (Fa. Merck, Darmstadt)

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8 % NaCl (Fa. Merck) in Aqua dest.

Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,2, 300mOsm)

Stammlösung:

42 g NaCl krist. (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 106400)

9,26 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O₂ p.a. (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 106580)

2,15 g K₂HPO₄ (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 105104)

Aqua bidest. ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 in Aqua bidest.

Zitratpuffer (10mM, pH6,0)*Stammlösung A:*

0,1 M Zitronensäure (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 100247)

(21,01 g $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$ in 1000 ml Aqua dest.)

Stammlösung B:

0,1 M Natriumcitrat (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 106448)

(29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$ in 1000 ml Aqua dest.)

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. Auf 500 ml auffüllen und mischen

TdT-Puffer (pH 7,2; 1 N HCL)

TRIS (Fa. Sigma, Taufkirchen, Nr. 340-22) 3,633 g

Na-Cacodylat (Fa. Sigma, Taufkirchen, Nr. 726-4) 29,96 g

$CoCl_2$ (Fa. Sigma, Taufkirchen, Nr. 60818) 0,238 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

TB-Puffer (pH 8)

NaCl (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 106400) 17,532 g

Na-Citrat (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 106448) 8,8233 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

DN-Puffer (pH 7,2; 1 N HCL)

TRIZMA base (Fa. Sigma, Taufkirchen, Nr. T-8524) 3,633 g

Na-Cacodylat (Fa. Sigma, Taufkirchen, Nr. 726-4) 29,96 g

$MgCl_2$ (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 105833) 0,812 g

Dithiothreitol (Fa. Sigma, Taufkirchen, D 9760)

Aqua bidest. ad 1000 ml

Imidazol/HCL-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol (Fa. Merck, Nr. 104716)

Aqua dest. Ad 1000 ml

Zugabe von 500 ml 0,1 M HCL (Fa. Merck, Darmstadt, Nr.100312)

Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

100 mg DAB (Fa. Fluka, Neu Ulm) in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCL-Puffer, pH 7,1 lösen, mischen, filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl H₂O₂ zugeben

PAPANICOLAOUs Lösung

PAPANICOLAOUs Lösung und Aqua dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren.

Tab. 9.1. Vergleichende Übersicht der Monoinfektionen und der Sekundärinfektionen in der Caco-2 Zellkultur

Alter in Tagen	Inkubationszeit			Monoinfektion			Sekundärinfektion			
	Rota- viren	Salmo- nellen	Anz. infiz. Zellen %	R/Zelle	S/Zelle	Anz. infiz. Zellen gesamt %	Anz. infiz. Zellen Rota %	Anz. infiz. Zellen Salm %	R/Zelle	S/Zelle
7	17 h		9,0±3,5	102,5±10,5						
7		3 h	9,7±0,2		1,0±0,1					
7	17 h	3 h				7,8±0,2	3,6±0,2	2,1±0,9	74±4,9	2,0±0,9
7	17 h	5 h				12,5±3,5	5,6±1,1	6,9±2,8	113±7,5	2,2±0,2
7	72 h		5,6±0,2	96,8±8,5						
7		5 h	7,9±2,1		1,9±0,2					
7	72 h	3 h				25,0±1,3	25,0±8,3	0,0	118±5,2	0,0
7	72 h	5 h				6,8±0,9	4,9±2,1	1,9±0,5	103±9,5	3,5±1,1
14	17 h		10,3±2,8	343,5±166,5						
14		3 h	8,1±0,5		2,3±0,6					
14	17 h	3 h				17,6±2,8	13,1±4,2	2,4±1,4	510±167,6	0,2±0,06
14	17 h	5 h				14,3±4,1	2,3±0,6	12,0±3,7	83±6,3	2,9±0,5
14	72 h		7,1±1,1	140,8±7,8						
14		5 h	11,5±1,0		2,0±0,5					
14	72 h	3 h				14,7±2,3	8,1±2,8	5,4±1,3	168±7,8	1,8±0,2
14	72 h	5 h				20,5±5,1	0,6±0,6	19,9±3,2	23,0±3,2	2,0±0,1
Legende zu Tab. 9.1:										
			R/Zelle	Anzahl der Rotaviren/Zelle		S/Zelle		Anzahl der Salmonellen/Zelle		
			Anz. infiz. Zellen	Anzahl infizierter Zellen						

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-A. Schoon für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die stets intensive und freundliche fachliche und geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. D. Schoon danke ich ebenfalls für die jederzeit freundliche und sachkundige fachliche Hilfe.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Dr. I. Hänel und Frau Dr. M. Elschner aus der „Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere“ für die stets nette und fachliche Hilfe und Beratung sowie der Bereitstellung des Probenmaterials.

Herrn Prof. Dr. K. Fehlhaber und allen Mitgliedern und Stipendiaten des Gaduiertenkollegs „Schlacht-tierbelastung und Produktsicherheit“ danke ich für die Organisation des Graduier-tenkollegs und die jederzeit gewährte, gute Mitarbeit, da ohne sie diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung der Disser-tation.

Ganz besonders möchte ich mich bei Heike bedanken. Sie hat in allen Phasen der Bearbeitung und Auswertung des Materials und der Entstehung meiner Arbeit mit konstruktiver Kritik, freundschaftlicher Hilfe und wissenschaftlichem Verstand zu der Entstehung beigetragen.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Pathologie möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in dieses hervorragende Team und die nette Zusammenarbeit bedanken: Insbesondere Frau Herzog, Frau Schleinitz und Frau Pleitz unterstützten mich bezüglich der histo-logischen Technik und Frau Creutzmann, Frau Kubaile-Jahn sowie Frau Schilling standen mir hinsichtlich der organisatorischen Sachen hilfreich zur Seite. Bernd, Lars und Ralf danke ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön sage ich Frau Langhof, die mir jederzeit bereitwillig und geduldig mit Rat und Tat bei der Elektronenmikroskopie zur Seite stand sowie auch Wippi, die mich bei der Anfertigung der immunhistologischen Präparate unterstützte und für alle meine Fra-gen und Probleme ein offenes Ohr hatte. Vielen Dank!

Mein großer Dank gilt allen Teamkollegen: Vor allem Anne B., Anne R., Chris, Birgit, Sarah, Matthias, Sylke, Simone, Ines, Tobi, Steffi, Olli, Kim und Ali, die mich jederzeit freundlich unterstützten und mir immer wieder verständnisvoll Mut machten.

Bei Christin bedanke ich mich recht herzlich für die konstruktiven Vorschläge sowie die Sorge um mein leibliches Wohl und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön richte ich an Katja, unsere Computerexpertin, die mir bei diversen EDV-Problemen geholfen hat und an Artur Wagner, der mich bei der Bildbearbeitung tatkräftig unterstützt hat.

Herrn Dr. K.-F. Schüppel möchte ich Dank sagen für seine jederzeitige Ansprechbarkeit, Geduld und die zahlreichen wertvollen Ratschläge.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich immer bei all' meinen gesetzten Zielen unterstützt, mich aufgebaut und mir geholfen hat, und mir stets Liebe und Verständnis entgegengebracht hat.